



# Rôle de la vasopressine dans les troubles du métabolisme glucidique : possible impact dans le développement du diabète

Christopher Taveau

## ► To cite this version:

Christopher Taveau. Rôle de la vasopressine dans les troubles du métabolisme glucidique : possible impact dans le développement du diabète. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066211>. <tel-01205820>

**HAL Id: tel-01205820**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01205820>**

Submitted on 28 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiopathologie  
(Ecole doctorale physiologie et physiopathologie ED394)

Présentée par

M. TAVEAU Christopher

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

« Rôle de la vasopressine dans les troubles du métabolisme glucidique :  
possible impact dans le développement du diabète »

Soutenue le 26 septembre 2014

Devant le jury composé de :

Mme. Bouby Nadine  
Mme. Housset Chantal  
Mr. Guillon Gilles  
Mme. Cruciani-Guglielmacci Céline  
Mr. Valet Philippe  
Mr. Tordjmann Thierry

Directeur de thèse (DR)  
Présidente du jury (PU-PH)  
Rapporteur (DR)  
Rapporteur (MCU)  
Examineur (Pr)  
Examineur (DR)

## **Laboratoire D'accueil**

Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U1138

Equipe 2 «Physiopathologie et thérapeutique dans les maladies vasculaires et rénales liées au diabète et à la nutrition » – Pr Roussel Ronan

Escalier E, 1<sup>er</sup> étage

15 rue de l'école de médecine

75006 Paris

# Remerciements

---

Je tiens à remercier, en premier lieu, l'ensemble des membres de mon jury de thèse. Je remercie Monsieur Guillon Gilles et Madame Cruciani-Guglielmacci Céline pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse. Je suis également très reconnaissant à Messieurs Valet Philippe et Tordjmann Thierry d'avoir accepté d'évaluer ces travaux en tant qu'examinateurs. Enfin, je souhaite grandement remercier Madame Housset Chantal d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également Monsieur Magnan Christophe d'avoir chaleureusement accepté d'être mon tuteur de thèse et Madame Fougelle Fabienne d'avoir présidé mon comité de mi-thèse. Merci à vous pour votre contribution dans la critique scientifique et de m'avoir aiguillé dans la poursuite de ces travaux.

Non sans raison, je remercie l'ensemble des membres de l'école doctorale ED394 « physiologie et physiopathologie » et ses directrices Madame Cremer Isabelle et Madame Monnot Catherine. Je remercie plus particulièrement Madame Bell Dominique qui a toujours été là pour répondre à l'ensemble de mes questions d'ordre administratif.

Je souhaite profondément adresser mes remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe 2 « Physiopathologie et thérapeutique des maladies vasculaires et rénales liées au diabète et à la nutrition » ainsi qu'à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Avant tout, je tiens profondément à remercier ma directrice de thèse, Madame Bouby Nadine, pour m'avoir choisi comme étudiant de thèse et ainsi m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet fort passionnant. Je vous remercie pour la grande confiance que vous m'avez accordée, au cours de ces trois années passées à vos côtés, tout en restant présente dès que j'ai eu besoin de vous. Merci pour votre grande disponibilité, votre écoute, votre sensibilité et votre patience que cela soit au cours de ma thèse mais aussi lors de la correction de mon manuscrit. Merci pour tous vos conseils précieux, vos encouragements et toute l'aide que vous m'avez apportée pour trouver une solution lorsque j'en manquais. Je n'oublierai pas toutes les discussions tant scientifiques que non-scientifiques que nous avons entretenues au cours de ma thèse. Je tiens véritablement à vous remercier pour votre générosité et votre humanité.

Je souhaite véritablement remercier Madame Bankir Lise, directrice de recherche émérite, sans qui ce projet n'aurait probablement pas vu le jour. Merci d'avoir pris contact avec Mr Melander Olle et, après moult discussions, avoir proposé de faire un projet de recherche encadrant vasopressine et diabète. Merci beaucoup pour toute l'aide apportée dans la réflexion scientifique et tous vos conseils. Votre grande richesse scientifique et votre gentillesse m'ont été de cruciaux atouts.

Merci grandement à Monsieur Alhenc-Gelas François, directeur de l'équipe à mon arrivée, pour m'avoir accepté au sein de son équipe. Merci pour tous les conseils que vous m'avez donnés au cours de mes trois ans de thèse. Merci de votre bonne humeur perpétuelle, de votre aménité et de votre soutien.

Merci également à Monsieur Roussel Ronan, professeur des universités, praticien hospitalier et nouvellement directeur de l'équipe, pour tout le temps que vous prenez pour partager vos connaissances. Merci de tous les conseils, discussions très enrichissantes et votre disponibilité malgré votre emploi du temps ministériel. Merci de votre patience, de votre confiance autour de ce travail. Merci pour votre magnanimité et votre grande qualité humaine.

Je désire également, et pas des moindres, remercier Monsieur Melander Olle, professeur des universités, praticien hospitalier et directeur de recherche, tout d'abord car je n'aurai pas pu accomplir ma thèse sans son appui. Je vous remercie infiniment d'avoir financé l'ensemble de ce projet. Je me souviendrai toujours du tout premier jour où nous nous sommes rencontrés, le 10 décembre 2010. J'étais relativement pétrifié surtout que mon anglais était très loin d'être au top. En ce sens, je vous remercie car vous m'avez accordé votre confiance, et pourtant plus de 1200 kilomètres nous séparaient. Grâce à nos réunions, nos échanges, vous avez énormément contribué à l'amélioration de mon niveau d'anglais. Merci pour votre sincérité, votre intégrité, votre gentillesse et également pour votre indulgence et votre patience.

Un merci un peu plus spécial à Madame Chollet Catherine pour tous les excellents moments que nous avons passé ensemble. Je n'ai pas compté mais durant toutes ces années, nous en aurons bu du café, et pas des plus mauvais. Merci pour tous ces petits carrés de chocolats noir, au lait avec ou sans parfum ajouté qui ont participé à mon soutien intellectuel et moral. Merci pour tous les fous rires échangés avant, après et entre des manipes. Je te remercie pour ta bonté, ton enthousiasme et ton côté souriant. Merci pour ton aide notamment au cours du sacrifice de tous mes petits ratons. Merci pour ton soutien, ta sympathie, et ta grande générosité à mon égard.

J'adresse un chaleureux remerciement à tous les autres membres de l'équipe : Mr Fumeron Frédéric, Mr Velho Gilberto, Mme Bellili-Munoz Naïma, Mr Nicolas Anthony, Mr Waeckel Ludovic, Mr Louis Potier, Melle Desposito Dorinne, Mme Vincent Marie-Pascale, Mme Bordu Florence, Mme Gendry Maryse, Mr Thangavel Michel et Melle El Boustany Ray. Je vous remercie grandement pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté durant cette thèse. Merci pour vos conseils tant scientifiques que non-scientifiques et vos différentes qualités personnelles qui ont contribué de près ou de loin à la bonne réalisation de ce projet. Merci de votre grande gentillesse et humanité. Je souhaite également remercier tous les étudiants que j'ai encadrés : Melle Szpigel Anaïs, Melle Ibrahim Rima, Melle Ainine Cilia et Melle Haubert Audrey. Merci de votre contribution et de votre joie de vivre.

Il m'est également impossible de ne pas remercier l'ensemble de nos collaborateurs : Mme Foulfelle Fabienne, Mme Hainault Isabelle, Mr Magnan Christophe, Mr Philippe Erwann, Mr Dairou Julien, Mme Paradis Valérie, Mme Colnot Nathalie, Mr Bichet Daniel et Mme Arthus Marie-Françoise. Je tiens vivement à vous remercier pour votre contribution dans la réalisation du projet et ainsi avoir contribué à répondre à certaines de mes interrogations.

J'aimerais également remercier très chaleureusement les deux personnes qui ont fait que j'ai pu démarrer ma thèse sur ce projet : Mme Bodineau Laurence et Mme Hus-Citharel Annette. Si vous n'aviez pas parlé de moi auprès de Nadine, quand vous avez su qu'elle cherchait une personne pour un projet de recherche, je n'aurai pas eu cette somptueuse chance de rencontrer tout ce beau monde. Je n'ai pas oublié les mois passés ensemble au cours de mon M2. Merci milles fois pour votre gentillesse, votre amabilité et votre générosité.

Merci à ma famille pour tout le soutien moral qu'ils ont pu m'offrir. Un merci profond à ma mère pour tout ce que tu as fait pour que je devienne ce que je suis maintenant. Merci pour toutes les valeurs que tu m'as transmises, pour tout ton amour, pour avoir fait en sorte que je ne manque de rien durant mon enfance. Merci d'être constamment présente quand j'ai besoin de toi, merci pour tout. Merci également à ma belle-famille pour toute votre gentillesse et tous les moments passés à vos côtés. Enfin, je remercie immensément mon compagnon Nicolas pour m'avoir soutenu, encouragé et réconforté. Merci pour tout ce que tu fais pour moi, de me faciliter la vie. Merci de me supporter vaillamment malgré mes bougonnements répétés, mes absences mentales. Merci de me conseiller quand il faut et d'être toujours à mon écoute notamment pour le récit de mes expériences ratées. A vous tous, je vous remercie pour votre fierté et votre présence qui m'ont été très réconfortant.

Enfin, je souhaite profondément à vous remercier tous pour votre soutien et l'attention à mon égard. Vos qualités scientifiques et humaines ont été de véritables atouts durant ces trois merveilleuses années.

# Liste des communications

---

## Communications orales

**Journée du département Physiologie** (Juin 2014, Paris). La vasopressine dans le métabolisme glucidique : un nouveau facteur de risque du diabète. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Fougelle F, Magnan C, Paradis V, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Journée de l'école doctorale** (Mai 2014, Paris). Vasopressin and glucose metabolism in Zucker obese rats. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Fougelle F, Magnan C, Paradis V, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Hydration for Health Annual Scientific Conference** (Juillet 2013, Evian-les-bains) Vasopressin in diabetes: a new player in disorders of glucose metabolism. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Fougelle F, Magnan C, Paradis V, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Journée des Jeunes Chercheurs** (Juin 2013, Paris). Chronic vasopressin treatment aggravates insulin resistance in impaired metabolism model of rat. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Ibrahim R, Ainine C, Chollet C, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Journées de l'école doctorale** (Mai 2013, Paris). Vasopressin in diabetes: a new factor in glucose metabolism disorders. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Fougelle F, Magnan C, Melander O, Roussel R, Bouby N.

## Communications affichées

**Société Française du Diabète** (Mai 2014, Paris). La vasopressine dégrade la tolérance au glucose dans un modèle de rat présentant un syndrome métabolique. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Ibrahim R, Chollet C, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Société de Neuroendocrinologie** (Septembre 2013, Maroc). Vasopressin: a new player in glucose metabolism disorders. **Taveau C**, Bankir L, Enhörning S, Ibrahim R, Chollet C, Melander O, Roussel R, Bouby N.

**Société Française du Diabète** (Mai 2012, Nice). La vasopressine augmente la glycémie à jeun : un nouveau facteur de l'homéostasie glucidique. **Taveau C**, Roussel R, Chollet C, Enhörning S, Bankir L, Melander O, Bouby N.

**Journée de l'école doctorale** (Mai 2012, Paris). Long-term effect of vasopressin on glycaemia in the rat: a novel factor in diabetes development. **Taveau C**, Roussel R, Chollet C, Enhörning S, Bankir L, Melander O, Bouby N.

# Liste des publications et prix

---

## Publications scientifiques

**Taveau C**, Chollet C, Waeckel L, Enhörning S, Roussel R, Bankir L, Melander O, Bouby N. Vasopressin V1a receptors are involved, in vivo, in glucose metabolism disorders in rats. En préparation.

**Taveau C**, Chollet C, Waeckel L, Desposito D, Bichet D, Arthus M-F, Magnan C, Philippe E, Paradis V, Fougelle F, Hainault I, Enhörning S, Velho G, Roussel R, Bankir L, Melander O, Bouby N. Vasopressin and hydration play a major role in the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats. *Diabetologia* 2014, en révision

Velho G, Bouby N, Hadjadj S, Matallah N, Mohammedi K, Fumeron F, Potier L, Bellili-Munoz N, **Taveau C**, Alhenc-Gelas F, Bankir L, Marre M, Roussel R. Plasma copeptin and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabetes Care* 2013 Nov; 36(11):3639-3645

Waeckel L, Potier L, Chollet C, **Taveau C**, Bruneval P, Roussel R, Alhenc-Gelas F, Bouby N. Antihypertensive role of tissue kallikrein in hyperaldosteronism in the mouse. *Endocrinology* 2012 Aug; 153(8):3886-3896

Bodineau L, **Taveau C**, Lê Quan Sang HH, Osterstock G, Queguiner I, Moos F, Frugière A, Llorens-Cortes C. Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology* 2011 Sep; 52(9):3492-3503

## Prix obtenus

Premier prix communication orale jeune chercheur « Hydration For Health annual scientific conference » décerné par la société Danone (Juillet 2013, Evian-les-bains). Water consumption improves insulin sensitivity and prevents to liver steatosis development in a model of metabolic syndrome.

Premier prix poster « Journée des jeunes chercheurs » décerné par le Centre de Recherche des Cordeliers (Juin 2012, Paris). Long-term effect of vasopressin on glycaemia in the rat: a novel factor in diabetes development.



# Résumé

---

## **Rôle de la vasopressine dans les troubles du métabolisme glucidique : possible impact dans le développement du diabète**

**Mots clés :** vasopressine ; antagoniste des récepteurs V1a ; antagoniste des récepteurs V1b ; métabolisme glucidique ; insulino-résistance ; stéatose hépatique

Il est bien établi que la vasopressine (AVP) est élevée dans le diabète tant humain qu'expérimental. Depuis les années 1970, il est connu qu'une administration d'AVP augmente transitoirement la glycémie chez l'homme et le rongeur. Cette action de la vasopressine pourrait être liée à une augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique par l'intermédiaire de ses récepteurs V1a. Les récepteurs V1b, quant à eux, sembleraient impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique en jouant, de manière glucose-dépendante, sur la sécrétion d'insuline ou de glucagon par le pancréas. Chez l'homme, plusieurs études récentes ont montré une association entre la copeptine (biomarqueur de la sécrétion d'AVP), et la survenue d'un diabète sucré ou d'une hyperglycémie, le syndrome métabolique et l'obésité. Dans l'équipe, nous avons montré une association inverse entre la consommation d'eau et le risque de survenue d'hyperglycémie dans la cohorte D.E.S.I.R. issue de la population générale.

Le but de mon projet de thèse a été de déterminer le rôle de la vasopressine et de la prise hydrique dans l'homéostasie glucidique chez le rat sain et dans un modèle de rat présentant un syndrome métabolique. Pour cela, nous avons utilisé des approches physiologiques et pharmacologiques. Les taux circulants de vasopressine ont été modifiés soit par perfusion continue de vasopressine par minipompes Alzet soit en augmentant la prise hydrique (ce qui induit une diminution de la sécrétion de vasopressine). Le rôle respectif des récepteurs V1a et V1b a été étudié à l'aide d'antagonistes spécifiques. La vasopressine administrée en aiguë chez le rat sain induit des effets dose-dépendant sur la glycémie et ces effets hyperglycémisants sont médiés par les récepteurs V1a. L'activation des récepteurs V1b ne modifie pas la sécrétion de l'insuline mais stimule en permanence de façon modérée la production de glucagon par le pancréas. Chez le rat sain une concentration élevée de vasopressine augmente à long terme la glycémie et cet effet est réversé par un antagoniste des récepteurs V1a. Ces effets ont été observés sur deux souches de rats (Sprague-Dawley et Zucker Lean). Chez le rat Zucker obèse, un taux élevé de vasopressine aggrave l'hyperinsulinémie à jeun et l'intolérance au glucose évaluée par des tests de tolérance au glucose, à l'insuline et la réponse à une charge de pyruvate. Un taux faible de vasopressine ne modifie pas la tolérance au glucose mais réduit très fortement la stéatose hépatique ainsi que le contenu du foie en cholestérol et triglycérides et l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique. Ces effets sont indépendants du pourcentage de la masse grasse, et de l'osmolarité plasmatique qui ne varient pas en fonction des différents traitements.

En conclusion, ces travaux montrent pour la première fois, qu'un taux élevé de vasopressine dégrade à long terme la tolérance au glucose ; a contrario, un régime fortement hydraté est protecteur. Ces résultats, en accord avec nos données épidémiologiques, démontrent un lien de causalité entre vasopressine/hydratation et désordre du métabolisme glucidique.

# Abstract

---

## **Role of vasopressin in glucose metabolic disorders: possible impact about diabetes development**

Key words: Vasopressin; V1a receptor antagonist; V1b receptor antagonists; Glucose metabolism; insulin resistance; liver steatosis

It is well established that vasopressin (AVP) level is high in both human and experimental diabetes. Since the 1970s, it is known that administration of AVP transiently increases glycaemia in humans and rodents. This action of vasopressin may be related to an increase in hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis through V1a receptors. V1b receptors seem to be involved in the regulation of glucose homeostasis through a glucose-dependent stimulation of insulin and glucagon pancreatic secretions. In humans, several recent studies have shown an association between copeptin (biomarker of AVP secretion) and the occurrence of diabetes mellitus or hyperglycemia, metabolic syndrome and obesity. Our team has shown a reverse association between water consumption and the risk of hyperglycemia in the general population (D.E.S.I.R cohort).

The aim of my thesis was to determine the role of vasopressin and fluid intake in glucose homeostasis in healthy rats and in a rat model of metabolic syndrome. For this, we used physiological and pharmacological approaches. Circulating levels of vasopressin have been modified either by continuous infusion of vasopressin through Alzet minipumps or by increasing the water intake (which induces a decrease in the vasopressin secretion). The respective roles of V1a and V1b receptors were studied using specific antagonists. Vasopressin, administered acutely in healthy rats, induces dose-dependent effects on the blood glucose levels. Hyperglycaemic effects are mediated by the V1a receptors. V1b receptor activation does not influence insulin secretion but stimulates moderately basal glucagon production by the pancreas. In healthy rats, a high concentration of vasopressin increases long-term blood glucose level and this effect is reversed by a V1a receptor antagonist. These effects were observed in two strains of rats (Sprague Dawley and Zucker Lean). In obese Zucker rats, a high vasopressin level worsens fasting hyperinsulinaemia and glucose intolerance evaluated by glucose and insulin tolerances and response to pyruvate load. A low vasopressin concentration does not affect glucose tolerance but drastically reduces hepatic steatosis, the content of cholesterol and triglycerides in liver and expression of genes involved in hepatic lipogenesis. These effects are independent of the percentage of body fat, and plasma osmolarity which did not changed with the different treatments.

In conclusion, these studies show for the first time, that long-term high vasopressin levels aggravate glucose tolerance whereas a highly hydrated diet is protective. These results, in agreement with our epidemiological data, demonstrate a causal link between vasopressin and/or hydration and glucose metabolism disorders.

# Table des Matières

---

Liste des Abréviations .....	12
Liste des figures et tableaux .....	13
Avant-propos .....	16

## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE** .....

17

## **PARTIE 1: La Vasopressine, une hormone multifonctionnelle** .....

17

### **I. De sa production à sa dégradation** .....

17

1. Localisation et synthèse peptidique.....	17
a. Site de production de la vasopressine : le Système Hypothalamo-Hypophysaire .....	17
b. Gène, prohormone et vasopressine .....	19
2. Sécrétion de la vasopressine.....	22
3. L'importance de la Neurophysine II .....	22
4. Demi-vie, clairance et dosage de la vasopressine .....	23

### **II. Régulation de la sécrétion vasopressinergique** .....

25

1. Le stimulus osmotique et le stimulus volémique .....	25
2. Vasopressine et soif.....	26
3. Autres stimuli impliqués .....	28

### **III. Récepteurs de la vasopressine** .....

29

1. Les récepteurs V2.....	29
2. Les récepteurs V1.....	32
a. Les récepteurs V1a : du gène à la protéine .....	32
b. Les récepteurs V1b : du gène à la protéine.....	32
c. Voie de signalisation des récepteurs V1a et V1b.....	34
d. Le développement d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs V1a et V1b ....	35
3. Internalisation et désensibilisation .....	38

### **IV. Localisation des récepteurs et fonctions biologiques de la vasopressine** .....

39

1. Localisation .....	39
2. Fonctions biologiques de la vasopressine .....	40
a. Rôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien .....	41
b. Rôle sur la fonction rénale .....	42
c. Rôle sur la pression artérielle.....	43

<b><u>PARTIE 2 : METABOLISME GLUCIDIQUE ET DIABETE</u></b>	44
<b><u>I. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition postprandiale</u></b>	45
1. La captation de glucose	45
2. Le devenir du glucose	48
a. La voie de la glycolyse	48
b. La voie des pentoses phosphates	50
c. Stockage du glucose en glycogène : la glycogénèse	50
d. Glucose et lipogénèse <i>de novo</i>	50
<b><u>II. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition de jeûne</u></b>	52
1. La voie de la glycogénolyse	52
2. La voie de la néoglucogénèse	54
3. Importance de la production extra-hépatique de glucose	56
4. Importance de la production de glucose pour l'organisme	57
<b><u>III. Régulations hormonales et nerveuses de l'homéostasie glucidique</u></b>	58
1. L'importance des hormones dans le contrôle du métabolisme glucidique	58
a. Rôle de l'insuline	58
b. Rôle du glucagon	61
c. Rôle des catécholamines	63
d. Rôle des glucocorticoïdes	64
2. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux	65
<b><u>IV. Le diabète</u></b>	66
1. Epidémiologie du diabète de type 2	67
2. Etiologie du diabète de type 2	67
a. Les facteurs génétiques	67
b. Les facteurs environnementaux	68
c. Le syndrome métabolique	69
3. La physiopathologie du diabète	70
a. Etat de l'insulino-résistance	70
b. Les mécanismes cellulaires de la résistance à l'insuline	71
c. Rôle des acides gras dans l'insulino-résistance	73
d. Stress du réticulum endoplasmique et résistance à l'insuline	74

<b><u>PARTIE 3: Vasopressine, trouble du métabolisme glucidique et diabète</u></b>	76
<b><u>I. Vasopressine et métabolisme glucidique</u></b>	76
<b><u>II. Vasopressine et trouble du métabolisme en lien avec le diabète</u></b>	80
a. Etudes cliniques : mise en évidence d'une association.....	80
b. Etudes expérimentales : vasopressine et trouble du métabolisme glucidique .....	82
<b>ETUDES EXPERIMENTALES</b>	84
<b>OBJECTIFS</b>	84
<b><u>ETUDE 1 : Rôle des récepteurs V1a et V1b dans les effets hyperglycémiantes aigus de la vasopressine</u></b>	85
<b><u>I. Introduction</u></b> .....	85
<b><u>II. Matériel et méthodes</u></b> .....	86
<b><u>III. Résultats et discussion</u></b> .....	89
<b><u>ETUDE 2 : Rôle de la vasopressine sur le métabolisme glucidique chez le rat sain</u></b>	103
<b><u>I. Introduction</u></b> .....	103
<b><u>II. Matériel et méthodes</u></b> .....	103
<b><u>III. Résultats et discussion</u></b> .....	107
<b><u>ETUDES 3/4 : Rôle de la vasopressine sur le métabolisme glucidique chez les rats Zucker Lean et Obèses</u></b> .....	116
<b><u>I. Introduction</u></b> .....	116
<b><u>II. Matériel et méthodes</u></b> .....	117
<b><u>III. Résultats et discussion</u></b> .....	126
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	155
Références bibliographiques .....	161
Annexes .....	197
Article scientifique .....	209

# Liste des Abréviations

---

ACTH : hormone adrénocorticotropine	LXR : récepteur X hépatique
ADH : hormone antidiurétique	mTORC : mammalian target of rapamycin
AGL : acides gras libres	OT (ou OXT) : ocytocine
AQP : aquaporine	PDK : phosphoinositide-dependent protein kinase
ATF : activating transcription factor	PEP : phosphoenolpyruvate
AVP : arginine-vasopressine	PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
CC : canal collecteur	PGC : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
CHO : chinese hamster ovary cells	PI3K : phosphoinositide 3 kinase
CHOP : C/EBP homologous protein	PIP2 : phosphatidylinositol bi-phosphate
ChREBP : carbohydrate responsive element binding protein	PKA : protéine kinase A
COPII : coat protein II	PKB : protéine kinase B
CRH : hormone corticotrope (corticolibérine)	PKC : protéine kinase C
CRTC : CREB regulated transcription coactivator	PLC $\beta$ : forme bêta de la phospholipase C
2-DOG : 2-déoxyglucose	PPA2 : protéine phosphatase A2
DAG : diacylglycérol	SHC : src homologous and collagen protein
DHAP : dihydroxyacétone phosphate	SGLT : co-transporteur glucose/sodium
EGP : endogeneous glucose production	SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
ENaC : canal sodique épithéliale	SREBP : sterol regulatory element-binding proteins
EPAC : protéine d'échange activée par l'AMPc	TRB3 : tribbles-related protein 3
F-1,6 BPase: fructose 1,6 biphosphatase	UPR : unfolded protein response
FAS : fatty acide synthase	VMA : vanillylmandelic acid
FOXO1: forkhead box protein O1	
G6Pase: glucose 6-phosphatase	
GA3P: glycéraldéhyde 3-phosphate	
GIP: gastric inhibitory polypeptide	
GIR: glucose infusion rate	
GLP-1 : glucagon like peptide-1	
GLUT : transporteur au glucose	
GPase : glycogène phosphorylase	
GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G	
GSK : glycogen synthase kinase	
GU : glucose uptake	
HHS : hypothalamo-hypophysaire surrénalien	
HNF : hepatocyte nuclear factor	
IKK $\beta$ : stress kinases I $\kappa$ B $\alpha$ kinase $\beta$	
IMC : indice de masse corporel	
IP3 : inositol triphosphate	
IP4 : inositol quatre phosphates	
IRE : insulin response element	
IRS : insulin receptor substrate	
JNK : c-Jun N-terminal Kinase	

# Liste des figures et tableaux

---

## **Introduction Bibliographique**

<u>Schéma 1</u> : Système Hypothalamo-Hypophysaire et vasopressine .....	18
<u>Schéma 2</u> : Du gène à l'hormone .....	20
<u>Schéma 3</u> : Cascade enzymatique impliquée dans la production de la vasopressine active ...	20
<u>Schéma 4</u> : Différences structurales entre la vasopressine et l'ocytocine .....	21
<u>Schéma 5</u> : Conséquences des variations plasmatiques osmotiques sur la soif et la sécrétion d'AVP .....	27
<u>Schéma 6</u> : Représentation schématique du récepteur V2 humain .....	30
<u>Schéma 7</u> : Voie de signalisation du récepteur V2.....	31
<u>Schéma 8</u> : Représentation schématique des récepteurs V1a et V1b humain.....	33
<u>Schéma 9</u> : Voie de signalisation induite par les récepteurs V1a et V1b.....	34
<u>Schéma 10</u> : Les fonctions biologiques de la vasopressine.....	40
<u>Schéma 11</u> : La glycolyse.....	49
<u>Schéma 12</u> : Lipogénèse <i>de novo</i> et régulations transcriptionnelles.....	51
<u>Schéma 13</u> : La glycogénolyse.....	53
<u>Schéma 14</u> : La néoglucogénèse .....	55
<u>Schéma 15</u> : Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules $\beta$ pancréatiques.....	59
<u>Schéma 16</u> : Voie de signalisation de l'insuline sur ses tissus cibles .....	60
<u>Schéma 17</u> : Rôle physiologique du glucagon .....	62
<u>Schéma 18</u> : Induction de la lipolyse par les catécholamines .....	64
<u>Schéma 19</u> : Acides gras libres et insulino-résistance.....	74
<u>Schéma 20</u> : Voies possibles d'action de la vasopressine sur l'altération du métabolisme glucidique .....	157
<u>Tableau A</u> : Variabilité structurale de la vasopressine suivant les espèces de vertébrés .....	22
<u>Tableau B</u> : Classification des différents transporteurs aux hexoses appartenant à la famille GLUT .....	46

## **Etudes expérimentales**

<u>Figure 1 :</u> Effets d'un prétraitement par des antagonistes des récepteurs V1a ou V1b sur l'augmentation de pression artérielle induite par l'injection aigue de doses croissantes de vasopressine chez le rat Sprague-Dawley .....	95
<u>Figure 2 :</u> Effets du prétraitement par l'antagoniste des récepteurs V1b sur la stimulation de l'activité de l'axe HHS par la vasopressine chez le rat Sprague-dawley .....	96
<u>Figure 3 :</u> Cinétique de la réponse glycémique suivant l'injection de différentes doses de vasopressine après prétraitement avec l'antagoniste des récepteurs V1a chez le rat sprague-Dawley .....	98
<u>Figure 4 :</u> Cinétique de la réponse glycémique suivant l'injection de différentes doses de vasopressine après prétraitement avec l'antagoniste des récepteurs V1b chez le rat Sprague-Dawley .....	100
<u>Figure 5 :</u> Effets de l'antagoniste des récepteurs V1b sur la sécrétion des hormones pancréatiques chez le rat Sprague-Dawley .....	101
<u>Figure 6 :</u> Effets chroniques de la vasopressine sur la glycémie à jeûn chez le rat Sprague Dawley et implication des récepteurs V1a .....	111
<u>Figure 7 :</u> Conséquences des différents traitements induisant un taux bas ou élevé de vasopressine sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez le rat Sprague-Dawley.....	112
<u>Figure 8 :</u> Effet de l'antagonisme des récepteurs V1a sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez des rats Sprague Dawley traités par de la vasopressine .....	114
<u>Figure 9 :</u> Effets de la vasopressine et de l'antagoniste V1a sur les paramètres glucidiques à jeun chez les rats Zucker Lean .....	131
<u>Figure 10 :</u> Conséquences des différents traitements sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez les rats Zucker Lean .....	132
<u>Figure 11 :</u> Effets de la vasopressine sur les paramètres glucidiques à jeun chez les rats Zucker obèses.....	134
<u>Figure 12 :</u> Conséquences des différents traitements sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez les rats Zucker obèses.....	136
<u>Figure 13 :</u> Réponse insulinémique au cours du test de tolérance au glucose chez les rats Zucker obèses .....	138
<u>Figure 14 :</u> Clamps Euglycémiques Hyperinsulinémiques chez les rats Zucker obèses.....	140



<u>Figure 15</u> :	Effets des différents traitements sur la production endogène de glucose à partir du pyruvate chez les rats Zucker obèses.....	142
<u>Figure 16</u> :	Glucagonémie à jeun et au cours du test de tolérance à l'insuline des rats Zucker obèses après 2 semaines de traitement .....	148
<u>Figure 17</u> :	Effet des différents traitements sur la concentration apélinergique chez les rats Zucker obèses .....	150
<u>Figure 18</u> :	Le régime hydraté empêche la survenue d'une stéatose chez les rats Zucker obèse .....	152
<u>Tableau 1</u> :	Paramètres physiologiques de la fonction rénale au cours du prétraitement avec un antagoniste du récepteur V1a ou du récepteur V1b.....	91
<u>Tableau 2</u> :	Amplitude de la réponse pressive à une injection aigüe de vasopressive chez des rats Sprague-Dawley prétraités ou non avec un antagoniste des récepteurs V1a ou V1b .....	94
<u>Tableau 3</u> :	Paramètres physiologiques des rats Sprague Dawley après 4 semaines de traitement avec un régime hydraté ou une perfusion chronique de vasopressine .....	108
<u>Tableau 4</u> :	Paramètres physiologiques des rats Sprague-Dawley après 4 semaines de traitement avec une perfusion chronique de vasopressine en présence ou non d'un antagoniste des récepteurs V1a .....	109
<u>Tableau 5</u> :	Niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes clés de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse ainsi que des gènes codant pour les transporteurs au glucose .....	113
<u>Tableau 6</u> :	Paramètres physiologiques des rats Zucker Lean après 4 semaines de traitements .....	128
<u>Tableau 7</u> :	Paramètres physiologiques des rats Zucker obèses après 4 semaines de traitement .....	129
<u>Tableau 8</u> :	Niveau d'expression des enzymes clés intervenant dans les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique chez les rats Zucker Lean	143
<u>Tableau 9</u> :	Expression des gènes des enzymes clés impliquées dans la production hépatique de glucose chez les rats Zucker obèses.....	144
<u>Tableau 10</u> :	Expression des gènes de facteurs de transcription et protéines du stress du réticulum endoplasmique.....	147

# Avant-propos

---

Cette thèse est le fruit de 3 années et demie de travail au sein de l'équipe 2 du Centre de Recherche des Cordeliers, équipe dirigée par Mr Alhenc-Gelas François et Mme Bouby Nadine puis par Mr Roussel Ronan. L'activité de recherche à temps plein m'a permis de réaliser moi-même en très grande partie l'ensemble des expériences présentées dans cette thèse.

La vasopressine et le diabète ont été au centre de mon intérêt. La vasopressine est une hormone étudiée depuis de très nombreuses années au sein de l'équipe par Mmes Bankir Lise et Bouby Nadine. Elles ont montré entre autres, par des travaux sur le rat, que la vasopressine à long terme pouvait avoir un effet néfaste sur la fonction rénale et en particulier dans la néphropathie diabétique, ce qui a été confirmé ensuite chez l'homme. L'arrivée de diabétologues dans l'équipe et la publication des premières études épidémiologiques suggérant un lien probable entre la vasopressine et la survenue d'un diabète de type 2, au début de ma thèse, ont été des déterminants dans la définition de mon sujet de thèse. Mon travail a donc été d'étudier plus particulièrement le rôle de la vasopressine dans l'altération du métabolisme glucidique en relation avec le diabète de type 2.

La première partie de mon travail a porté sur le rôle des récepteurs V1a et V1b sur les effets métaboliques aigus de la vasopressine. Ce travail a permis de confirmer, *in vivo*, les données déjà connues *in vitro* et *ex vivo*. Les trois autres parties s'intègrent dans l'établissement d'un lien de causalité entre vasopressine et trouble du métabolisme glucidique dans deux modèles de rats sains et un modèle de syndrome métabolique. Cette thèse débute par une introduction générale sur la vasopressine, le diabète de type 2 et la relation existante entre les deux. Elle est suivie par les différentes études réalisées au cours de ces 3 années. Chaque étude est précédée d'une introduction et suivie d'une conclusion où les résultats sont analysés et discutés en détail. Enfin, une conclusion générale vient clore ce travail.

En espérant que vous prendrez plaisir à lire ce travail.

# Introduction bibliographique

---

## **PARTIE 1: La Vasopressine, une hormone multifonctionnelle**

### **I. De sa production à sa dégradation**

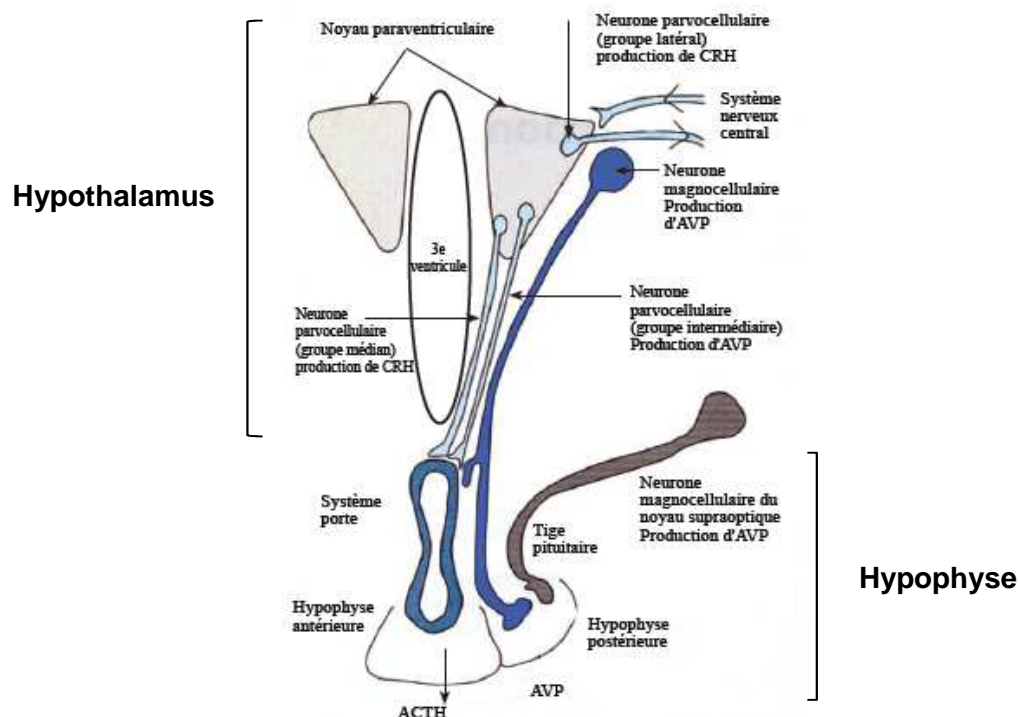
La vasopressine (AVP) est une neurohormone libérée dans la circulation systémique par la neurohypophyse. En ce même lieu, il est sécrété une autre neurohormone très proche structuralement de la vasopressine mais n'ayant pas les mêmes fonctions biologiques : l'ocytocine (OT). La vasopressine a un rôle principalement antidiurétique au niveau du rein permettant une réabsorption d'eau via son action sur le tubule collecteur. Elle permet à l'organisme de contrôler son volume extracellulaire ainsi que son osmolarité plasmatique. Cependant, les toutes premières études, ayant permis l'identification de cette hormone, ont été réalisées sur son effet vasoconstricteur lui donnant ainsi son nom. Plus tard, il sera découvert son action antidiurétique lui donnant le sigle anglais d'ADH pour « AntiDiuretic Hormone ». Un grand nombre de travaux ont également montré le rôle central de cette neurohormone dans les comportements sociaux, l'agressivité, l'apprentissage, la mémoire ou encore l'anxiété et la dépression.

#### **1. Localisation et synthèse peptidique**

##### **a. Site de production de la vasopressine : le Système Hypothalamo-Hypophysaire**

La structure de la neurohypophyse est typiquement un élément neural qui diffère de l'apparence glandulaire des autres organes endocriniens. En 1937, Ernst Scharrer développe le concept de production et de libération d'hormones par des neurones: connu sous le nom général de neurosécrétion exercée par des cellules neuronales neurosécrétrices. Ces cellules neurosécrétrices, situées dans l'hypothalamus, possèdent des axones qui innervent la neurohypophyse. Ce lien existant entre l'hypothalamus et la neurohypophyse sera alors considéré comme une structure intégrale référencée : Système Hypothalamo-Hypophysaire.

Le système neurosécrétoire hypothalamo-hypophysaire de la vasopressine est constitué de neurones, issus des noyaux hypothalamiques paraventriculaires et supraoptiques, ayant des terminaisons axonales au niveau du plexus sanguin primaire de la neurohypophyse (**Schéma 1 : Système Hypothalamo-Hypophysaire et vasopressine**). Le noyau supraoptique est intégralement composé de neurones magnocellulaires alors que le noyau paraventriculaire est divisé en une subdivision magnocellulaire latérale et une subdivision parvocellulaire médiane. Les neurones magnocellulaires projettent directement leurs axones vers la neurohypophyse en transitant par l'éminence médiane interne alors que les neurones parvocellulaires projettent vers l'adénohypophyse en transitant par l'éminence médiane externe (Vandesande F. et al, 1977). Au niveau de la neurohypophyse, les fibres vasopressinergiques entrent dans la région centrale du lobe neural de l'hypophyse et établissent une connexion étroite depuis la terminaison axonale avec les capillaires sanguins (Van Leeuwen F.W. et al, 1979).

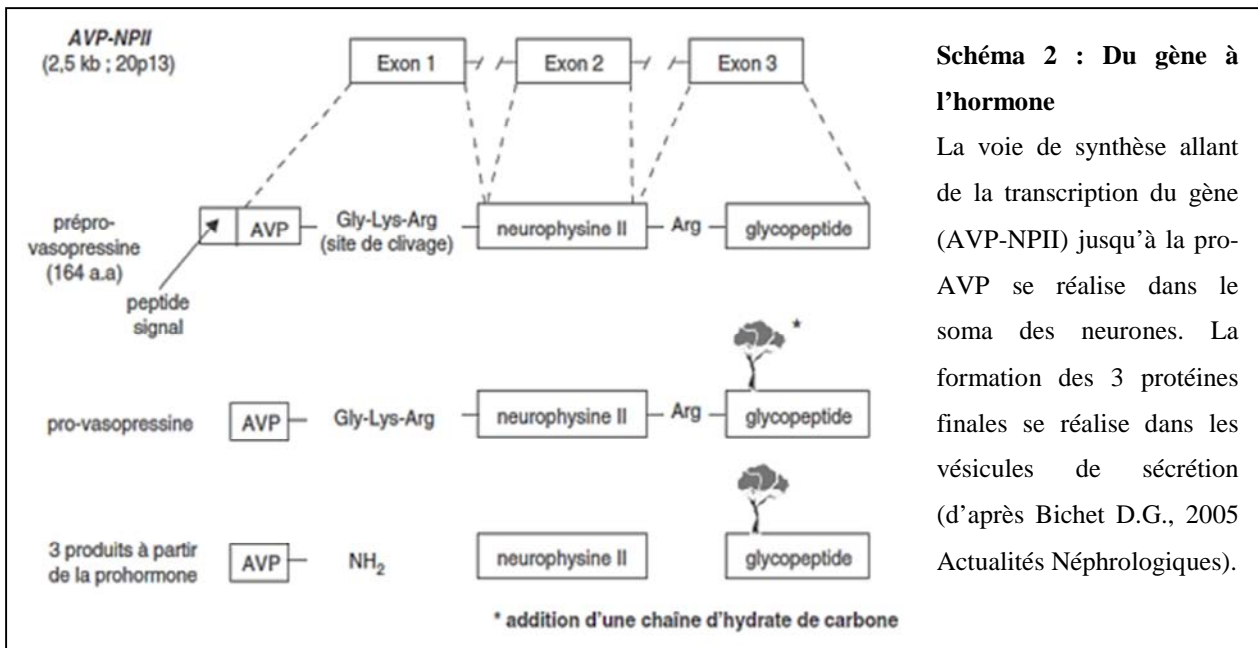


**Schéma 1 : Système hypothalamo-hypophysaire et vasopressine**

Le système hypothalamo-hypophysaire est constitué de deux structures comprenant l'hypothalamus et l'hypophyse reliées par l'intermédiaire de la tige pituitaire (ou tige hypophysaire). La synthèse de la vasopressine a lieu principalement dans les noyaux hypothalamiques et se poursuit au cours du transport antérograde vers la neurohypophyse. La sécrétion de la vasopressine se fait au niveau de la neurohypophyse pour ses actions périphériques mais une partie peut être sécrétée dans l'adénohypophyse pour stimuler la libération d'ACTH suite à un stress (d'après Blanchard A., communication 2004, MAPAR).

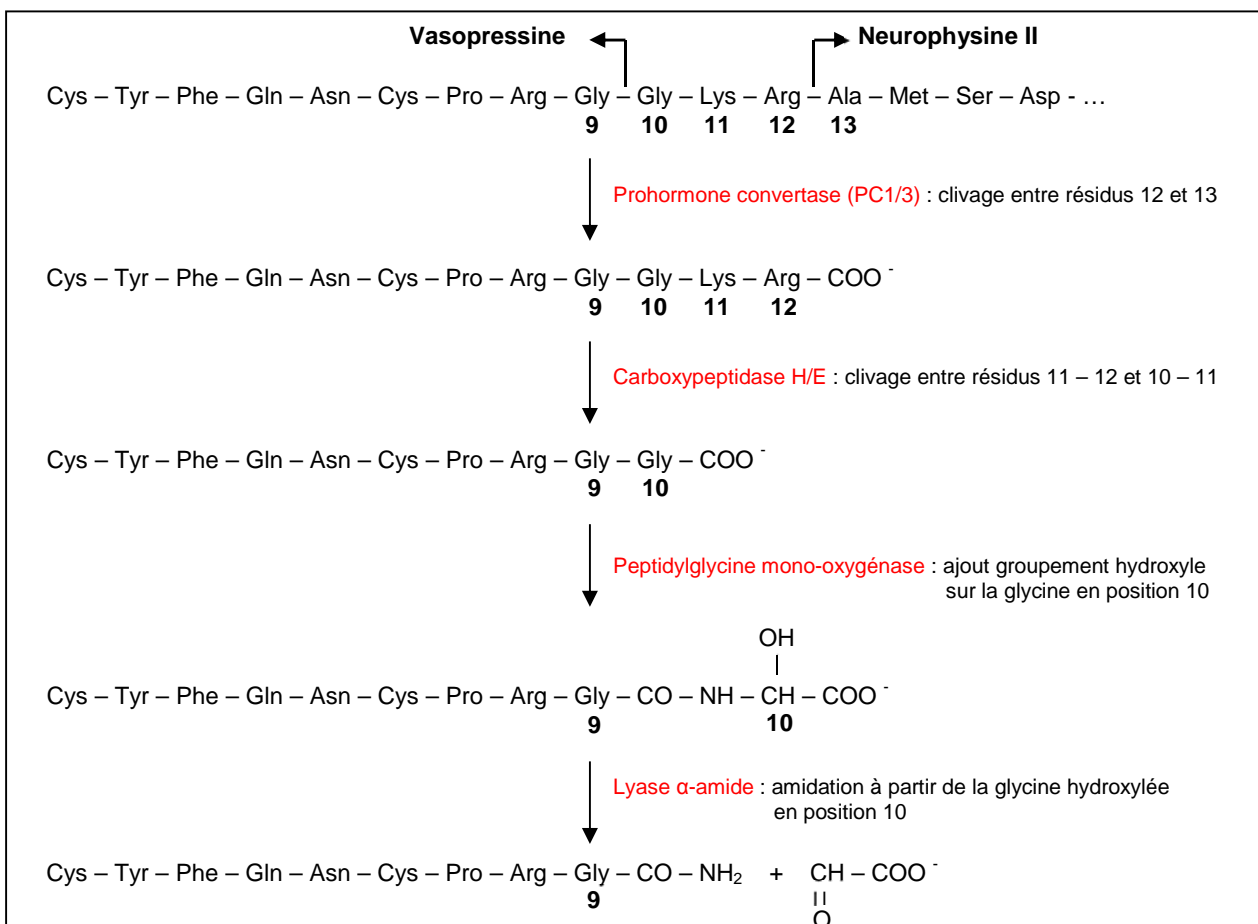
## **b. Gène, prohormone et vasopressine**

La vasopressine, du fait de son importance physiologique, nécessite une transcription et une traduction continues de la protéine et de ses précurseurs. Le gène de la vasopressine (AVP-NPII), localisé dans la région chromosomique 20p13, est constitué de 3 exons et de 2 introns pour une taille d'environ 2 kb (Hara Y. et al, 1990). Le premier exon code pour un peptide signal, l'hormone, un espaceur de 3 acides aminés (-Gly-Lys-Arg-) et le premier acide aminé de la partie N-terminale de la neurophysine II. Le second exon code pour le reste de la neurophysine II (acides aminés 10 – 76) et le dernier exon code pour la partie C-terminale de la neurophysine II, un site de clivage arginine et une glycoprotéine de 39 acides aminés connue sous le nom de copeptine. La traduction de l'ARNm forme la pré-provasopressine (prépro-AVP), protéine de 164 acides aminés, qui est convertie en pro-AVP dans le réticulum endoplasmique rugueux après excision du peptide signal, repliement adéquat par des protéines chaperonnes et l'ajout de chaînes d'hydrate de carbone. La pro-AVP rejoint ensuite l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules d'adressage COP II où elle subit d'autres étapes de maturations (ajout de chaînes glycosylées) puis est emballée dans des vésicules de sécrétion dense à centre large (Burbach J.P.H. et al, 2001 ; Kaufman R.J. et al, 2002). En cas de mal repliement de la pro-AVP, celle-ci est externalisée du réticulum endoplasmique rugueux et elle sera dégradée dans le cytosol par le protéasome. Au cours du transport axonal des vésicules de sécrétion, des processus protéolytiques et non-protéolytiques opèrent afin de former définitivement trois protéines à partir de la pro-AVP : l'AVP, la neurophysine II et la copeptine. **(Schéma 2 : Du gène à l'hormone ; Schéma 3 : Cascade enzymatique impliquée dans la production de la vasopressine active).**



## Schéma 2 : Du gène à l'hormone

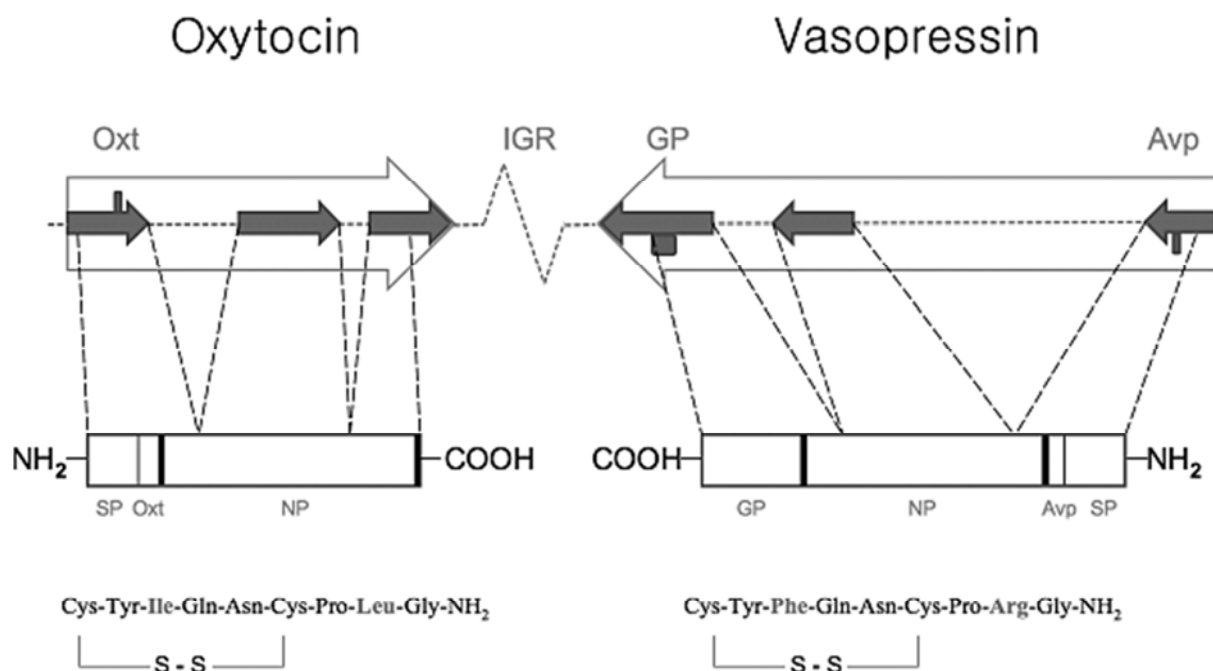
La voie de synthèse allant de la transcription du gène (AVP-NP II) jusqu'à la pro-AVP se réalise dans le soma des neurones. La formation des 3 protéines finales se réalise dans les vésicules de sécrétion (d'après Bichet D.G., 2005 Actualités Néphrologiques).



## Schéma 3 : Cascade enzymatique impliquée dans la production de la vasopressine active

La synthèse de la vasopressine, à partir de son précurseur pro-AVP dans les vésicules de sécrétion, s'effectue par un complexe enzymatique. Chez les mammifères, la première étape vise à séparer la copeptine du reste de la prohormone. Ensuite, le complexe AVP – Neurophysine II est clivé et la vasopressine subit une amidation de sa partie C-terminale. A la fin du transport axonal, les vésicules neurosécrétrices contiennent trois protéines : la vasopressine, la neurophysine II et la copeptine (d'après Acher R., 1995 Frontiers in Neuroendocrinology).

La vasopressine est un neuropeptide de 9 acides aminés présentant un pont disulfure entre les deux groupements cystéines (Cys<sup>1</sup> – Cys<sup>6</sup>) et qui diffère respectivement de l'ocytocine seulement par deux acides aminés : la phénylalanine en position 3 est remplacée par une isoleucine et l'arginine en position 8 est remplacée par une leucine (**Schéma 4 : Différences structurales entre la vasopressine et l'ocytocine**). Bien qu'elle porte le nom général de vasopressine, il en existe une certaine variabilité suivant les espèces. Chez la plupart des mammifères (Homme compris), nous parlons d'arginine-vasopressine (Arg-vasopressine ; AVP) alors que chez le porc, on retrouve la lysine-vasopressine (l'arginine est remplacée par la lysine en position 8). Dans certaines espèces vertébrées non-mammifères (notamment les poissons osseux), l'homologue est la vasotocine dans laquelle la phénylalanine en position 3 est remplacée par une isoleucine (**Tableau A : Variabilités structurales de la vasopressine suivant les espèces de vertébrés**).



**Schéma 4 : Différences structurales entre la vasopressine et l'ocytocine**

Les deux gènes sont composés de trois exons (flèches grises) séparés par deux introns et sont localisés sur le même chromosome mais ils sont transcrits en direction opposée. Ils sont séparés l'un de l'autre par une région intergénique (IGR) dont la longueur varie en fonction des espèces. Les prépro-hormones contiennent un peptide signal (SP), AVP ou OT, neurophysine (NP) et une glycoprotéine (GP) dans le cas de l'AVP. Les deux protéines possèdent deux cystéines en positions 1 et 6 formant un pont disulfure. Sept acides aminés sont communs et seulement deux diffèrent entre les deux protéines (d'après Caldwell H.K. et al, 2008 Progress in Neurobiology).

Les vertébrés		
Séquences	Noms	Espèces
Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly	Arginine-vasopressine (AVP, ADH)	Plupart des mammifères
Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly	Lysine-vasopressine (LVP)	Porc, phacochère et certains marsupiaux
Cys-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly	Phenyl-vasopressine	Certains marsupiaux
Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly	Vasotocine	Non-mammifères

**Tableau A : Variabilité structurale de la vasopressine suivant les espèces de vertébrés**

La vasopressine est une neurohormone constituée de 9 acides aminés quel qu'en soit l'espèce considérée. Néanmoins, la séquence peptidique est variable de 1 à 5 acides aminés suivant les espèces et du groupe paraphylétique. Les acides aminés, en rouge, représentent les résidus différents de l'arginine-vasopressine chez les vertébrés (adapté d'après Acher R., 1995 *Frontiers of Neuroendocrinology*).

## 2. Sécrétion de la vasopressine

De par sa double fonction comme neuropeptide et hormone, la vasopressine peut être transportée aussi bien dans l'adénohypophyse que la neurohypophyse par l'intermédiaire de populations neuronales bien distinctes. La sécrétion neurohypophysaire se réalise par exocytose entraînant la libération concomitante de la vasopressine, de la neurophysine II et de la copeptine (Matthews E.K. et al, 1973 ; Douglas W.W., 1973, 1974). Durant ce processus d'exocytose, la membrane de la vésicule de sécrétion fusionne avec la membrane plasmatique de la terminaison axonale du neurone. Cette fusion membranaire va permettre le passage du contenu de la vésicule dans le plexus primaire de la neurohypophyse puis dans la circulation systémique (Nagasawa J. et al, 1970 ; Douglas W.W., 1971 ; Boudier J.L., 1974).

## 3. L'importance de la Neurophysine II

La neurophysine II est située sur le même précurseur que la vasopressine. C'est une protéine constituée d'une chaîne peptidique de 93 acides aminés avec sept ponts disulfures et ayant une structure tridimensionnelle constituée d'hélices  $\alpha$  (5%) et de feuillets  $\beta$  (40%) (Acher R, 1968 ; Land H. et al, 1982).

Tout comme la vasopressine, la neurophysine II est présente dans le corps cellulaire et dans les vésicules de sécrétion (Dean C.R. et al, 1968 ; Hope D.B., 1973) et elle est primordiale à la biosynthèse et la neurosécrétion de la vasopressine. En effet, elle dispose d'une séquence



peptidique hautement conservée permettant le transfert de la prépro-AVP depuis le réticulum endoplasmique rugueux jusqu'à l'appareil de Golgi. De plus, comme protéine chaperonne, elle facilite le transport antérograde de l'AVP (Ginsburg M. et Ireland M., 1964 ; Breslow E. et Walter R., 1972) en maintenant l'hormone dans la vésicule, en évitant les modifications de formation des ponts disulfures pour lesquels l'hormone est particulièrement sensible et en la protégeant de toute dégradation protéolytique. Seuls les trois premiers résidus de la vasopressine sont importants pour sa liaison avec la neurophysine. Ces résidus vont interagir avec quatre résidus de la neurophysine qui sont l'aspartate en position 30, le glutamate en positions 31 et 47 et la tyrosine en position 49 (Breslow E., 1975 ; Acher R., 1979). Une mole de neurophysine est capable de lier une mole de vasopressine (Acher R., 1968 ; Land H. et al, 1982). L'importance de la neurophysine est illustrée par le rat Brattleboro, atteint de diabète insipide central avec un défaut de sécrétion de la vasopressine (Sokol H.W. et al, 1976). Ces rats présentent une mutation de la neurophysine II générant une altération de sa structure tertiaire. La neurophysine II n'est alors plus capable de se lier à la vasopressine (Repaske D. et al, 1996, Kim J. et al, 1997). Chez l'homme, deux mutations de la neurophysine II, avec la substitution de la Glycine<sup>57</sup> en Sérine<sup>57</sup> (Ito M. et al, 1991) et celle de la Glycine<sup>17</sup> en Valine<sup>17</sup> (Bahnsen U. et al, 1992), sont associées avec un diabète insipide.

#### **4. Demi-vie, clairance et dosage de la vasopressine**

Il est relativement difficile de pouvoir quantifier le taux sanguin en vasopressine car 1) 90% de la vasopressine sécrétée est liée aux plaquettes (Preibisz J.J. et al, 1983 ; Kluge M. et al, 1999), 2) elle est très rapidement dégradée (Baumann G. et al, 1976), 3) il s'agit d'une hormone instable (Robertson G.L. et al, 1973) et 4) sa petite taille rend difficile de pouvoir réaliser un dosage par Elisa. Chez l'animal sain et contrairement à l'homme, la concentration d'AVP est souvent proche de la limite de détection des dosages actuels (0,3 pg/ml) (Colson P.H. et al, 2011). Cependant, malgré ces difficultés de dosages, l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC en anglais) ou par immunoréactivité ont permis d'établir que la demi-vie de la vasopressine est inférieure à 5 minutes (Forsling M.L. et al, 1973 ; Lundin S. et al, 1989). La concentration plasmatique de vasopressine dépend de son taux de sécrétion et de son taux d'élimination par clairance rénale ou dégradation enzymatique. Cette dégradation rapide est liée à la présence d'aminopeptidases (appartenant à la famille des exopeptidases) exprimées dans la plupart des organes et primordiales pour différents processus protéiques tels que la maturation, la dégradation et la

stabilité. Parmi elles, on retrouve en particulier les aspartyl-, arginyl- et alanyl-aminopeptidases (Krege, J.H. et Katz V.L., 1990 ; Krege J.H. et al, 1993 ; Zambotti-Villela L. et al, 2007). Chez le rat, il a pu être déterminé que la clairance métabolique de la vasopressine est de l'ordre de  $15 \text{ ml.min}^{-1}$  par kilogramme de poids corporel (Lauson H.D., 1967). Autrement dit, l'organisme peut se débarrasser, en 1 minute, de toute la vasopressine contenue dans 15 ml de sang. En fait, la vasopressine est souvent mesurée directement dans l'urine car, d'une part, elle est 50 à 100 fois plus concentrée que dans le plasma et, d'autre part, il a été montré que l'excrétion urinaire de vasopressine est proportionnelle aux valeurs plasmatiques quand l'excrétion osmolaire reste stable (Robertson G.L., 1976).

Depuis peu, l'estimation de la concentration plasmatique de vasopressine a été facilitée par la mise au point du dosage de la copeptine. Les fonctions physiologiques de la copeptine ne sont pas encore élucidées. Toutefois, il a été suggéré qu'elle intervenait dans la conformation structurale du précurseur de la vasopressine (pro-AVP) qui est un prérequis dans sa maturation protéolytique (Nagy G. et al, 1988). Ce processus passerait par l'intermédiaire du système canéxine-calréticuline qui a la particularité d'interagir principalement avec les protéines glycosylées, d'induire le bon repliement protéique et ainsi d'augmenter la formation d'hormones actives (Schrag J.D. et al, 2003). Comme indiqué précédemment, la copeptine et la vasopressine sont issues de la même prépro-hormone et la copeptine est libérée dans le sang en quantité équimolaire à la vasopressine. Par contre, elle a un poids moléculaire supérieur et elle est plus stable que la vasopressine (Jochberger S. et al, 2006 ; Morgenthaler N.G. et al, 2006 ; Balanescu S. et al, 2011). L'utilisation de la copeptine comme marqueur diagnostique et pronostique dans plusieurs pathologies (l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque, l'hyponatrémie, le diabète sucré, la néphropathie diabétique, l'insuffisance rénale chronique) a fait l'objet de nombreuses publications (Dobsa L. et Edozien K.C., 2013).

## **II. Régulation de la sécrétion vasopressinergique**

La neurosécrétion de la vasopressine est essentiellement contrôlée par les variations de l'osmolarité plasmatique et de la volémie. Néanmoins d'autres facteurs peuvent conduire à une augmentation de cette sécrétion.

### **1. Le stimulus osmotique et le stimulus volémique**

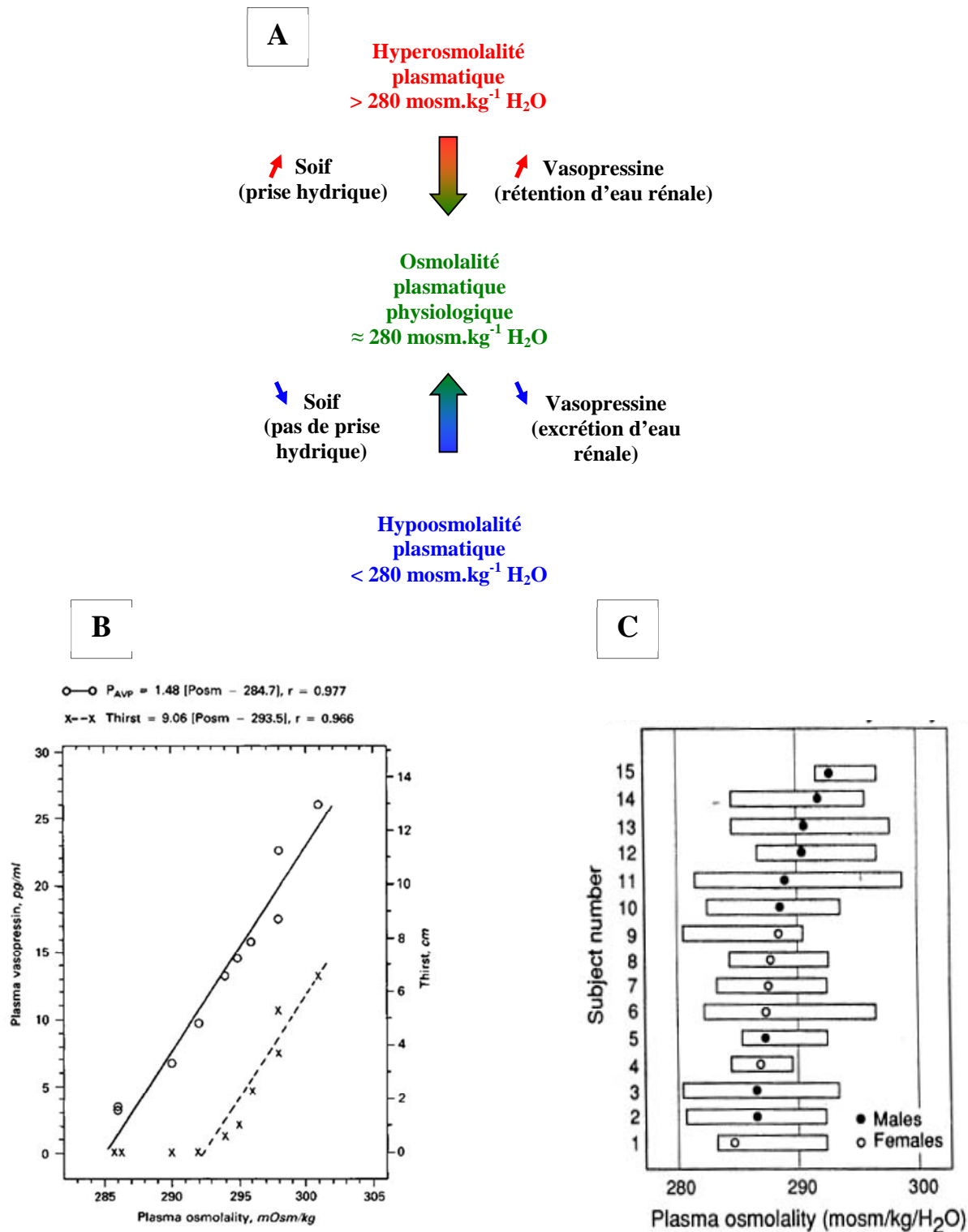
Le stimulus le plus important de sécrétion de vasopressine est une augmentation de l'osmolarité plasmatique. A l'inverse, une baisse de l'osmolarité diminue sa sécrétion. Cette régulation s'exerce par des osmorécepteurs localisés dans l'hypothalamus et plus particulièrement au niveau de l'organum vasculosum de la lame terminale (Almli C.R. et Weiss C.S., 1974 ; Coburn P.C. et Stricker E.M., 1978 ; Thrasher T.N., 1982). Des travaux datant des années 70 ont rapporté aussi l'existence d'osmorécepteurs hépatiques mais qui seraient surtout sensibles à l'hypoosmolarité (Niiijima A., 1969 ; Andrews W.H.H. et Orbach J., 1974 ; Adachi A. et al, 1976). La sensibilité des osmorécepteurs n'est pas la même pour tous les solutés. Le sodium, qui est l'osmole plasmatique majoritaire, est le soluté qui stimule le plus la sécrétion de vasopressine. Le mannitol, administré expérimentalement, est aussi un puissant stimulant de la sécrétion de vasopressine. Par contre, l'urée et le glucose, stimulent cette sécrétion plus faiblement pour un même changement d'osmolarité (Hirata Y. et al, 1995).

La sécrétion de vasopressine est aussi stimulée par une réduction de la volémie et de la pression artérielle (Stricker E.M., 1966 ; Dunn F.L. et al, 1973 ; Schiltz J.C. et al, 1997). Ces variations sont détectées par des volorécepteurs situés au niveau de l'oreille droite (Schreihofer A.M. et al, 1997) et des barorécepteurs carotidiens. Il est important de noter que la sécrétion de vasopressine est beaucoup plus sensible à des changements d'osmolarité plasmatique qu'à des variations de volémie. Une augmentation d'osmolarité de seulement 0,5% soit environ  $1,5 \text{ mosm.kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$  peut faire doubler la concentration plasmatique de vasopressine. La vasopressinémie s'élève proportionnellement à l'osmolarité plasmatique (Hammer M. et al, 1980), par contre, la réponse aux changements de volume-pression est exponentielle (Benmansour M. et al, 1980). Des modifications de volume et de pression assez importantes, d'au moins 10% sont nécessaires pour augmenter significativement la vasopressinémie. Ainsi lors d'une hémorragie importante faisant baisser le volume

plasmatique de 20 à 30%, le taux de vasopressine peut atteindre des valeurs beaucoup plus élevées qu'après une stimulation osmotique, la concentration de vasopressine est alors largement supérieure à celle induisant un effet antidiurétique maximal.

## **2. Vasopressine et soif**

En plus de la vasopressine, la soif est aussi impliquée dans l'équilibre hydrique de l'organisme (Thornton S.N., 2010) et dans le maintien de l'osmolarité plasmatique dans des limites très étroites (**Schéma 5A**). Soif et sécrétion de vasopressine sont les deux phénomènes régulant les entrées et les sorties d'eau. Le contrôle de la sécrétion de vasopressine d'une part, et de la soif d'autre part, partagent ainsi certaines voies de signalisation communes (Stricker E.M. et Sved A.F., 2002). La soif est également stimulée par une augmentation de l'osmolarité plasmatique mais le niveau nécessaire pour la déclencher est légèrement supérieur au seuil osmotique de sécrétion de la vasopressine (**Schéma 5B**). Ainsi dans les conditions normales, une très légère augmentation d'osmolarité plasmatique va induire une augmentation de vasopressine qui va agir sur le rein pour augmenter la réabsorption d'eau, si cet effet antidiurétique est insuffisant pour corriger l'osmolarité plasmatique, alors la soif va se déclencher. Ainsi la vasopressine exerce un effet antidiurétique continu plus ou moins important tout au long du nyctémère tandis que la soif est seulement perçue de façon discontinue et secondaire. Il est à noter que les seuils de déclenchement de la sécrétion de vasopressine et ceux de la soif sont variables d'un individu à l'autre (**Schéma 5C**) mais stables chez un même individu. Il existe également une variabilité entre les hommes et les femmes. En effet, il a été montré que la sécrétion de vasopressine était plus sensible aux variations osmotiques chez l'homme que chez la femme (Stanchenfeld N.S. et al, 2001). L'effet du genre sur la sécrétion ou les effets de la vasopressine a été décrit dans plusieurs études (Perucca J. et al, 2008a). Ainsi, l'osmolalité urinaire est plus élevée chez les hommes que les femmes. Des études chez le rat suggèrent que les effets de la vasopressine n'ont pas la même intensité dans les deux sexes (Sato K. et al, 1995). La réponse antidiurétique à une même dose d'hormone exogène est plus forte chez le mâle que chez la femelle (Wang Y.X. et al, 1993).



**Schéma 5 : Conséquences des variations osmotiques plasmatiques sur la soif et la sécrétion d'AVP**

Suivant les conditions d'hyper- ou d'hypoosmolarité, des osmorécepteurs sont stimulés et induisent la stimulation ou l'inhibition de la prise hydrique et de la sécrétion de vasopressine. A) Bilan schématique des réponses hydriques et vasopressinergiques (d'après Bourque C.W., 2008 Nature Reviews Neuroscience) B) Relation entre la concentration plasmatique de vasopressine ou la prise hydrique et l'osmolalité plasmatique chez un sujet sain au cours d'une perfusion saline (5% NaCl) (Robertson G.L., 1984 Kidney International). C) Variations interindividuelles des seuils osmotiques de sujets sains. Les extrémités gauches et droites représentent, respectivement, les seuils de la soif et de la sécrétion de la vasopressine. Les points correspondent à l'osmolalité moyenne (Robertson G.L., 1984 Kidney International).

### **3. Autres stimuli impliqués**

La sécrétion de vasopressine peut également être stimulée par l'intermédiaire d'autres stimuli tels que les nausées, les vomissements, l'hypoxie, le stress, la douleur et la nicotine. Dans cette section, je ne détaillerai pas la relation entre la vasopressine et le stress du fait qu'une partie du mémoire lui en est entièrement dédiée au chapitre IV.

#### **✓ Les nausées et vomissements**

La nausée représente un stimulus très puissant de sécrétion de vasopressine, puisque la concentration plasmatique de vasopressine peut être multipliée par 100 voire plus (Rowe J.W. et al, 1979 ; Sørensen P.S. et Hammer M., 1985 ; Grant P.J. et al, 1986). Cette augmentation de vasopressine pourrait survenir pour anticiper les pertes d'eau liées au vomissement éventuel et ainsi favoriser sa conservation.

#### **✓ L'hypoxie**

L'hypoxie stimule la sécrétion des hormones neurohypophysaires et induit une augmentation de la concentration plasmatique de vasopressine chez le rat (Forsling M.L. et Aziz L.A., 1983) et chez l'homme (Heyes M.P. et al, 1982).

#### **✓ La douleur**

Chez le rongeur, il a pu être mis en évidence que la vasopressine jouait un rôle analgésique. En effet, l'administration de vasopressine diminue la perception de la douleur chez le rat (Berntson G.G. et Berson B.S., 1980 ; Berkowitz B.A. et Sherman S., 1982 ; Luttinger D. et al, 1984) et le seuil de sensibilité à la douleur est plus faible chez des rats Brattleboro qui ont une incapacité de sécréter de la vasopressine (Bodnar R.J. et al, 1982).

#### **✓ La nicotine**

La nicotine entraîne la sécrétion des hormones hypophysaires et la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (Husain M.K. et al, 1975 ; Wilkins J.N. et al, 1982). Cet effet est dépendant de la dose (Seyler L.E. Jr et al, 1986 ; Goldsmith S.R. et al, 1988 ; Hunsballe J.M. et al, 2001).

### **III. Récepteurs de la vasopressine**

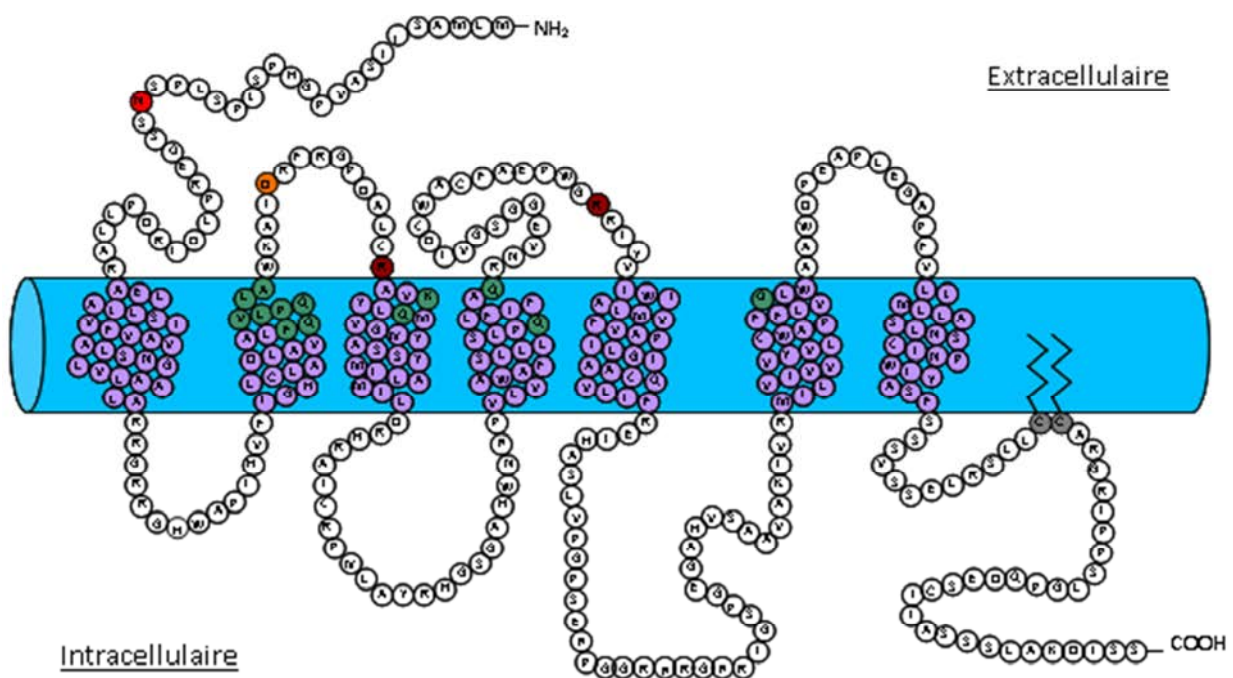
La vasopressine agit sur trois types de récepteurs appartenant à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G : Les récepteurs V2, V1a et V1b. Bien que la vasopressine ait pu être synthétisée dans les années 1950, ce n'est que 20 ans plus tard que des approches pharmacologiques puis des approches de biologie moléculaire ont permis de discriminer les différents types de récepteurs en terme d'expressions tissulaires, de fonctions biologiques et de voies de signalisation. Il a été mis en évidence la présence de deux récepteurs vasopressinergiques bien distincts en termes de signalisation et de fonctions biologiques (Michell R.H. et al, 1979). D'un côté, le récepteur hépatique V1a stimulant la voie de la phospholipase C avec production d'inositol triphosphate et de diacylglycérol et de l'autre, le récepteur rénal V2 activant la voie de l'adénylate cyclase. Dix ans plus tard, Jard S et ses collaborateurs (1986) découvrent la présence d'un nouveau récepteur dans les cellules de l'adénohypophyse. Ainsi, début des années 1990, on distinguait 3 types de récepteurs à la vasopressine avec les récepteurs V2 périphériques, les récepteurs V1a périphériques et centraux et les récepteurs V1b périphériques. Des techniques d'immunohistochimie, montreront que finalement, les récepteurs V2 sont principalement périphériques alors que les récepteurs V1a et V1b sont localisés en périphérie et dans le système nerveux. Le présent chapitre a pour but de décrire la structure et la signalisation des différents types de récepteurs. Leur localisation tissulaire sera décrite ultérieurement (chapitre IV).

#### **1. Les récepteurs V2**

##### **Du gène à la protéine**

En 1992, Birnbaumer et ses collaborateurs ont cloné, pour la première fois chez l'homme et par une approche d'expression génomique, le récepteur vasopressinergique responsable de l'activité antidiurétique (Birnbaumer M. et al, 1990 ; 1992). Au cours de la même année, ils démontrent que le gène codant pour le récepteur V2 est localisé sur le chromosome X en position q28, dans la région chromosomique identifiée comme le locus du diabète insipide néphrogénique (Seibold A. et al, 1992). Le même procédé a été réalisé chez le rat, dans lequel, les auteurs sont partis d'une banque d'ADN complémentaire de rein de rats comme base de données (Lolait S.J. et al, 1992). Le gène du récepteur V2 est très conservé dans beaucoup d'espèces (les primates, bovins, rongeurs) avec une moyenne de 90% d'identité par

rapport à l'homme. Le gène entier contient 4636 paires de bases (pb) et il est constitué de trois exons et de deux introns très courts et encadrés par des séquences d'épissages consensus. Le deuxième exon représente la majeure partie du récepteur V2 dans la mesure où il code environ 80% de la protéine native allant du 1<sup>er</sup> domaine transmembranaire jusqu'au début du 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire. La transcription du gène donnera lieu à un ARN messager de 1682 nucléotides qui code pour une protéine de 371 acides aminés. Le récepteur V2 dispose 1) d'un site de glycosylation extracellulaire sur l'asparagine 22 (Asn<sup>22</sup>) (Innamorati G et al, 1996), 2) d'un pont disulfure, entre les deuxième et troisième boucle extracellulaire (Cys<sup>112</sup> – Cys<sup>142</sup>), nécessaire au bon repliement du récepteur et 3) de deux résidus cystéines en C-terminal qui ont été démontrés pour subir une palmitoylation (Cys<sup>341</sup> – Cys<sup>342</sup>) et favorisant ainsi son ancrage membranaire (Sadeghi H.M. et al, 1997). Un ensemble de travaux ont répertorié les différents sites de fixation de la vasopressine sur son récepteur V2. Le **schéma 6** est une représentation schématique du récepteur V2 humain (Bichet D.G. et al, 1993 ; Mouillac B. et al, 1995a ; Ufer E. et al, 1995 ; Lolait S.J. et al, 1995a ; Ala Y. et al, 1998).



#### Schéma 6 : Représentation schématique du récepteur V2 humain

Les acides aminés en violet représentent les domaines transmembranaires I à VII. L'acide aminé en rouge correspond au site de glycosylation sur l'asparagine 22 alors que les deux cystéines grisées sont les sites de palmitoylation. Les acides aminés marqués en vert, en orange et en marron indiquent les sites de fixation de la vasopressine déterminée par mutagenèse dirigée, l'utilisation de ligand spécifique du récepteur et l'étude des mutations dans le diabète insipide néphrogénique, respectivement.



### Voie de signalisation des récepteurs V2

Le récepteur V2, couplé exclusivement avec une protéine Gs (Liu J. et Wess J., 1996 ; Erlenbach I. et Wess J., 1998), entraîne l'activation de l'adénylate cyclase qui est située dans le feuillet interne de la membrane cellulaire. Une fois activée, cette dernière permet la transformation de l'ATP en AMPc. L'AMPc activera la protéine kinase A (PKA) induisant une translocation des aquaporines 2 (AQP2) cytosoliques au niveau du pôle apical des cellules principales du canal collecteur (CC) et permettant ainsi une augmentation de la réabsorption d'eau (Hoffert J.D. et al, 2008 ; McDill B.W. et al, 2006). La liaison de la vasopressine au récepteur V2 induit aussi une augmentation rapide de calcium intracellulaire, un processus qui semble important pour l'exocytose des AQP2. Cet effet pourrait être médié par l'intermédiaire de la voie PLC $\beta$  mais uniquement en condition de forte expression du récepteur ou de forte concentration en vasopressine (Zhu X. et al, 1994). En revanche, la voie de l'adénylate cyclase en activant une protéine d'échange EPAC (Exchange Proteins directly Activated by AMPc) serait prépondérante sur la mobilisation calcique (Yip K.P., 2006) (Schéma 7 : Voie de signalisation des récepteurs V2).

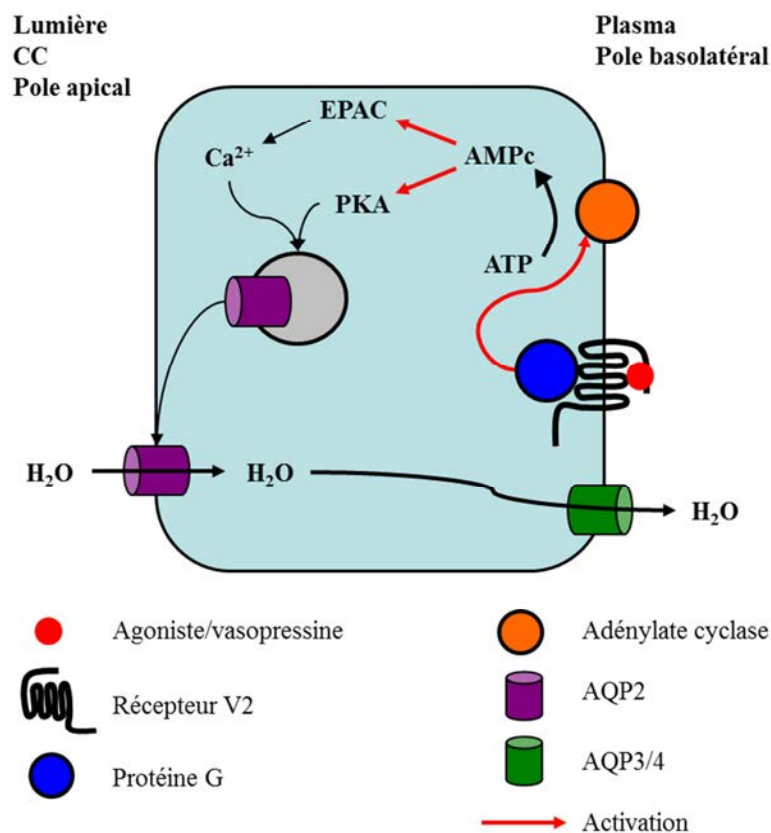


Schéma 7 : Voie de signalisation des récepteurs V2

## **2. Les récepteurs V1**

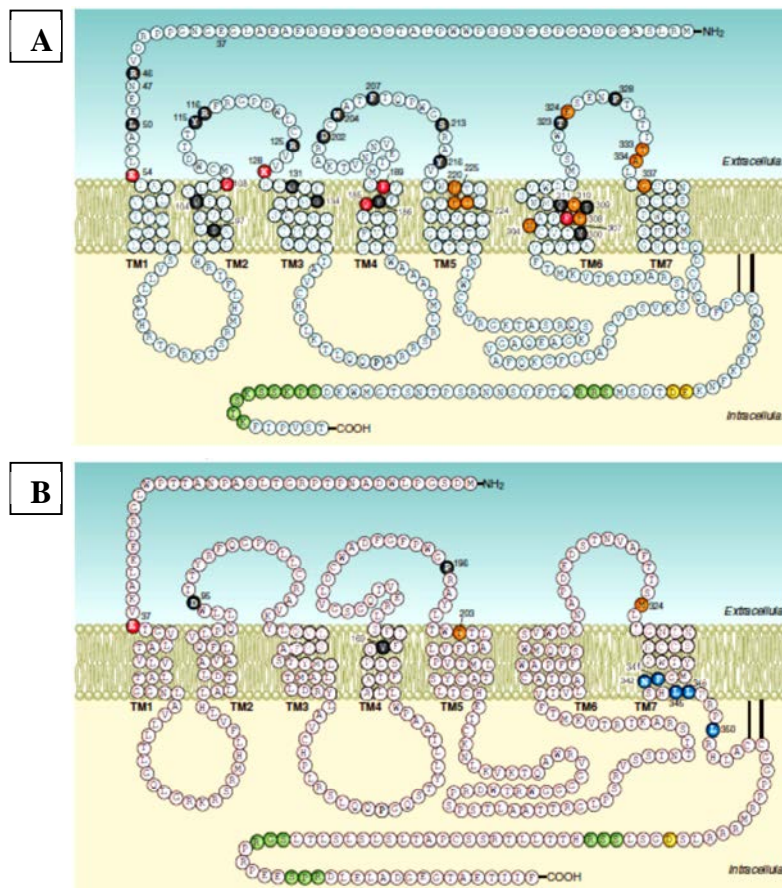
### **a. Les récepteurs V1a : du gène à la protéine**

Le gène codant pour le récepteur V1a est situé sur le chromosome 12 en position q14-q15. Comme le récepteur V2, il est présent en une seule copie et il est conservé dans beaucoup d'espèces avec une moyenne de 82% d'identité par rapport à l'homme. Le gène, d'environ 6241 pb, est constitué de deux exons séparés par un intron. Le premier exon code la région 5' non-traduite ainsi que les 323 premiers acides aminés du récepteur. En revanche, le deuxième exon dispose de la région codant pour les 95 acides aminés restant et la région 3' non-traduite. (Thibonnier M. et al, 1994 ; 1996). Une fois transcrit, le gène donnera naissance à un ARNm de 4154 nucléotides qui code pour une protéine de 418 acides aminés. Ce récepteur présente des sites de glycosylation sur les asparagines 14, 27 et 196 (Asn<sup>14</sup>, Asn<sup>27</sup> et Asn<sup>196</sup>), des sites d'ancrages membranaires suite à une palmitoylation des cystéines 359, 365 et 366 et des séquences consensus spécifiques (Ser/Thr-X-Arg/Lys) d'une phosphorylation par la protéine kinase C (Thibonnier M. et al, 1994). Un ensemble de travaux ont répertorié les sites de fixation de la vasopressine sur son récepteur V1a ce qui est résumé dans le **schéma 8A : Représentation schématique des récepteurs V1a et V1b humain** (Chini B. et al, 1995 ; Mouillac B. et al, 1995b ; Thibonnier M. et al, 2000 ; Hawtin S.R. et al, 2006).

### **b. Les récepteurs V1b : du gène à la protéine**

Contrairement aux récepteurs V2 et V1a qui présentent une grande identité de séquence protéique, le récepteur V1b dispose uniquement 39 à 50% d'identité de séquence avec les deux autres récepteurs chez l'homme (Sugimoto T. et al, 1994). Le gène du récepteur V1b, présent en une seule copie, est situé sur le chromosome 1 en position q32 et comme pour les récepteurs V1a et V2, il est bien conservé dans différentes espèces (Rousseau-Merck M.F. et al, 1995). Long de 10 kb, le gène est constitué de deux exons séparés par une région intronique (5,4 kb) (René P. et al, 2000). Le premier exon comporte une séquence 5' non-traduite, les 938 nucléotides codant pour les domaines transmembranaires I à VI et une partie de la troisième boucle extracellulaire. Le deuxième exon code pour le reste de la séquence protéique et une longue séquence 3' non-traduite contenant deux sites probables de polyadénylation. Une fois transcrit, le gène donnera un ARNm d'environ 5,2 kb donnant naissance à une protéine de 424 acides aminés chez l'Homme et 421 acides aminés chez le

rat. Le récepteur est constitué : 1) d'un site de N-glycosylation sur l'Asn<sup>21</sup> ; 2) d'un pont disulfure entre les deux premiers domaines transmembranaires par les cystéines 107 et 186 et 3) de 2 sites de palmitoylation concernant les cystéines 355, 356 ou 385 (Kennedy M.E. et Limbird L.E., 1993) et 4) de 3 séquences consensus pour la phosphorylation par la PKC (Ser/Thr-X-Arg/Lys) (Kennelly P.J. et Krebs E.G., 1991). Les différents sites de fixations de la vasopressine au récepteur V1b sont résumés dans le **schéma 8B : Représentation schématique des récepteurs V1a et V1b humain** (Kunkel M.T. et Peralta E.G., 1993 ; Pittel Z. et Wess J., 1994).

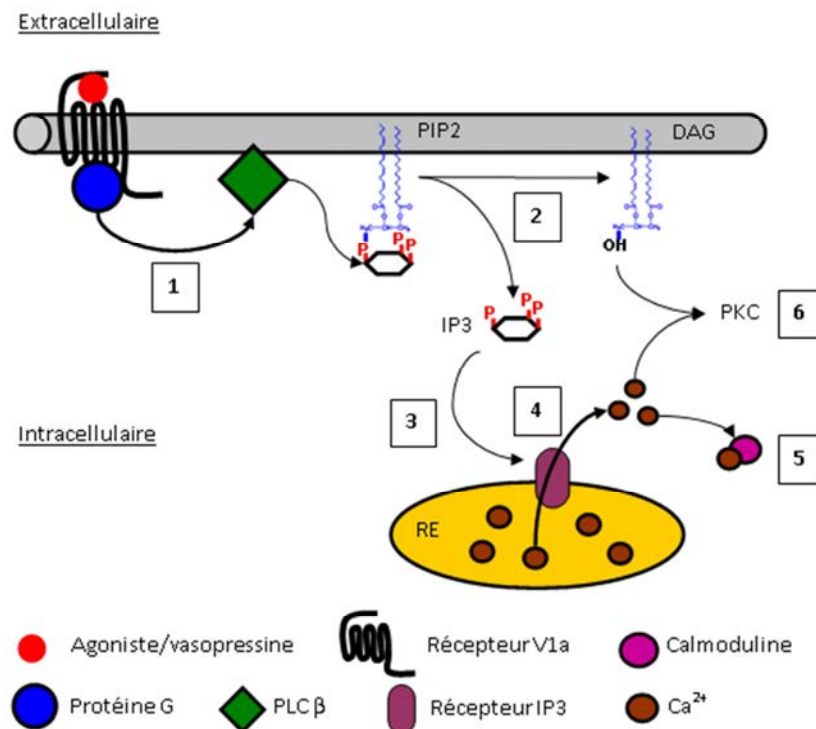


**Schéma 8 : Représentation schématique des récepteurs V1a et V1b humain**

A) Schéma du récepteur V1a et B) Schéma du récepteur V1b. Les acides aminés colorés correspondent aux acides aminés importants pour la liaison avec la vasopressine (en noir), les sites consensus de kinases spécifiques des RCPG (en jaune), le site consensus PKC (en vert). Les acides aminés propres à la liaison des antagonistes sont également représentés en orange et ceux intervenant dans la liaison indifférenciée antagoniste/agoniste sont en rouge. Les acides aminés importants pour l'adressage membranaire du récepteur sont en bleu (d'après Koshimizu T.A. et al, 2012 Physiological Review).

### c. Voie de signalisation des récepteurs V1a et V1b

Les récepteurs V1a et V1b sont couplés à une protéine Gq/ $\alpha 11$  qui active, parmi les 6 classes de phospholipase C (PLC), la PLC $\beta$ . Il s'agit d'une enzyme transmembranaire responsable de l'hydrolyse de la fonction ester entre le glycérol et le groupement phosphate du phosphatidyl 4,5-biphosphate (PIP2). Cette activité hydrolytique conduira à la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). L'IP3 (second messenger) se dirigera directement vers son récepteur présent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, entraînant une libération accrue des stocks de calcium dans le cytosol. L'IP3 peut également être phosphorylé pour former de l'IP4 conduisant à une mobilisation plus soutenue du calcium (Changya L. et al, 1989). Une fois libéré, le calcium sera pris en charge par une calmoduline ou une protéine liant le calcium. Le DAG (partie membranaire du PIP2) activera la protéine kinase C en présence de calcium (Thibonnier M., 1992) (**Schéma 9 : Voie de signalisation induite par les récepteurs V1a et V1b**).



**Schéma 9 : Voie de signalisation induite par les récepteurs V1a et V1b**

Schéma représentant la principale voie de signalisation des récepteurs V1a et V1b. 1) l'activation du récepteur par la vasopressine entraîne l'activation de la PLC $\beta$  par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Gq ; 2) la PLC $\beta$  hydrolyse le PIP2 en DAG et IP3 ; 3) 4 molécules d'IP3 se fixent sur le récepteur situé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) ; 4) le calcium passe du RE au cytosol ; 5) une partie du calcium libéré est pris en charge par les calmodulines et autres protéines liant le calcium et 6) l'autre partie permettra, avec le DAG, l'activation de la PKC.

Outre l'activation de la voie PLC $\beta$ , le récepteur V1a a été associé avec les voies de la phospholipase A2 et de la phospholipase D qui, respectivement, conduisent aux voies de la cyclooxygénase et de la PKC seule (Briley E.M. et al, 1994). Il a pu être démontré, *in vitro* dans des cellules CHO, que le récepteur V1a était capable de stimuler la voie de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K), de la calmoduline/calcium kinase II, de la PKC et des MAP kinases pour induire une réponse mitogénique (Thibonnier M. et al, 2000). *In vitro*, la vasopressine à des concentrations supérieures à 5 nM est également capable de stimuler la production d'AMPc et la voie des MAP kinases dépendante de la PLC et de la PKC dans les cellules surexprimant récepteurs V1b (Nishioka N. et al, 1995 ; Thibonnier M. et al, 1997 ; Pena A. et al, 2007a).

#### **d. Le développement d'agonistes et d'antagonistes aux récepteurs V1a et V1b**

Les récepteurs V1a et V1b de la vasopressine ont la même voie de signalisation passant par la PLC et la mobilisation de calcium. Comme nous le verrons plus tard (Partie 3), les effets métaboliques de la vasopressine passent par l'intermédiaire de ces deux récepteurs. Le développement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de ces récepteurs a permis de déterminer le type de récepteurs susceptible d'induire les effets métaboliques de la vasopressine.

##### Agonistes et antagonistes des récepteurs V1a

Le premier agoniste disposant d'une activité vasopressive a été développé en 1964 par Huguenin R.L. Ce composé, portant le nom de [Phe<sup>2</sup>]OVT, a longtemps été considéré comme un agoniste spécifique des récepteurs V1a dû au fait que son action vasopressive est 225 fois plus importante que son effet antidiurétique. Cependant, au regard de son affinité pour les récepteurs V1a (K<sub>i</sub> : 9,57 nM et 65,2 nM chez l'homme et le rat respectivement), cet agoniste ne peut être considéré comme sélectif des récepteurs V1a (Mouillac B. et al, 1995 ; Manning M. et al, 2012). Trente plus tard, un autre agoniste (F-180) a été montré être très affin et sélectif chez l'homme mais en revanche, il n'est pas sélectif des récepteurs V1a chez le rat (Andrés M. et al, 2002). En 2011, la société pharmaceutique Ferring a développé un nouvel agoniste spécifique des récepteurs V1a. Cet agoniste (FE 202158) est un analogue peptidique de la vasopressine disposant d'une action à court-terme mais avec une forte activité et affinité pour les récepteurs V1a chez de nombreuses espèces telle que l'homme et le rat. L'administration intraveineuse de FE 202158 entraîne, *in vivo*, une augmentation de la

pression artérielle chez le rat sans affecter la fonction rénale (Laporte R. et al, 2011). Parallèlement, le F-180 a été modifié pour conduire à un autre agoniste, le FE 201874. Les tests de liaisons effectués sur des lignées cellulaires et sur des membranes plasmiques issues de tissus exprimant les différents récepteurs de la vasopressine, et les tests de physiologiques montrent que cet agoniste est très sélectif pour le récepteur V1a chez l'homme et le rat. Cependant, chez la souris, cet agoniste présente une meilleure affinité pour le récepteur à l'ocytocine que pour le récepteur V1a (Marir R. et al, 2013).

Le développement d'antagonistes aux récepteurs à la vasopressine a débuté au début des années 1970. Cependant, tous ces antagonistes étaient des analogues peptidiques qui disposaient d'une faible biodisponibilité par voie orale. En 1991, Yamamura Y et ses collaborateurs ont mis au point le tout premier antagoniste non-peptidique aux récepteurs V1 : OPC-21268. Les auteurs ont ainsi démontré que cet antagoniste compétitif déplace la liaison de la vasopressine tritiée au niveau du foie ( $IC_{50} : 10^{-7}$  M) et dans une moindre mesure sur les membranes plasmiques rénales ( $IC_{50} : 10^{-4}$  M) et induit une vasoconstriction chez le rat. Les auteurs ont alors pu mettre au point le premier antagoniste V1 non-peptidique et fonctionnant par compétition avec la vasopressine. Les études *in vivo*, chez le rat, ont confirmé ces observations (Yamamura Y. et al, 1991). D'autres antagonistes, spécifiques des récepteurs V1a, ont également été mis au point (Howl J. et al, 1991 ; Schmidt A. et al, 1991 ; Barbeis C. et al, 1995, Strakova Z. et al, 1997 ; Ferris C.F. et al, 2006) et montré se lier aux membranes plasmiques de foie de rats. Dans ces travaux de thèse, nous avons choisi d'utiliser l'antagoniste non-peptidique SR-49059 (Relcovaptan) développé par Sanofi-Aventis en 1993. Il a été démontré par des études de liaison que le SR-49059 a une forte affinité (nM) et sélectivité pour le récepteur V1a sur des membranes de foie de rats et humains. En comparant son affinité avec celle de l'OPC-21268, Serradeil-Le Gal C et ses collaborateurs ont montré que le SR-49059 était 150 fois plus affin que l'OPC-21268 sur les membranes de foie de rats et 500 fois plus efficace sur les membranes de foie humain. Le SR-49059 inhibe l'activité vasoconstrictrice de la vasopressine sur des artères caudales isolées de rats et inhibe, *in vivo*, la réponse pressive de la vasopressine, suite à son administration par voie intraveineuse ou orale. In fine, le SR-49059 est un antagoniste compétitif des récepteurs V1a présentant la plus grande affinité et sélectivité. Il dispose également, contrairement à l'OPC-21268, d'une grande activité chez l'homme et le rongeur. De plus, cet antagoniste est administrable par voie orale et il n'a pas de propriétés agonistes *in vitro* et *in vivo* (Serradeil-Le Gal C. et al, 1993, 1994, 1996, 2002a).

### Agonistes et antagonistes des récepteurs V1b

Contrairement aux récepteurs V1a et V2, la découverte et le développement d'agonistes des récepteurs V1b, spécifique de l'homme et du rat, a commencé dans les années 2000 (Manning M. et al, 2008, 2012). Le premier agoniste des récepteurs V1b (d[Cha<sup>4</sup>]AVP) a été développé en 2002 par Derick S et ses collaborateurs puis des analogues du dAVP (1-déamino AVP) ont été développés et montrés très sélectifs des récepteurs V1b par modification du résidu en position 4 (Cheng L.L. et al, 2004). Tous ces agonistes sont très sélectifs des récepteurs V1b humain mais ils présentent une sélectivité et une activité V2 supplémentaires chez le rat. Il a donc été nécessaire de développer des agonistes très sélectifs et affins pour le récepteur V1b de rat. Ces agonistes ont vu le jour en 2007 et présentent une modification supplémentaire en position 8 en plus de celle en position 4 (Pena A. et al, 2007a, 2007b). Parmi tous ces agonistes, chez le rat, le d(Leu<sup>4</sup>-Lys<sup>8</sup>)AVP semble être le plus prometteur. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence que le d(Leu<sup>4</sup>-Lys<sup>8</sup>)AVP induisait une augmentation de la sécrétion insulinémique dans des pancréas perfusés chez le rat. Cet effet est inhibé par l'ajout d'un antagoniste aux récepteurs V1b (SSR-149415).

Actuellement, seulement deux sociétés ont développé des antagonistes aux récepteurs V1b. Le premier antagoniste est sorti en 2002 par la société Sanofi-Aventis (SSR-149415 : Nelivaptan) et le second en 2006 par la société Organon (ORG-52186). Dans l'ensemble, ces antagonistes sont non-peptidiques, actifs oralement et ils présentent une forte sélectivité et affinité pour les récepteurs V1b chez l'homme et le rat (Serradeil-Le Gal C. et al, 2002b, 2005, 2007 ; Craighead M. et al, 2008). Toutefois chez l'homme, il a été démontré que le SSR-149415 pouvait aussi être un antagoniste des récepteurs à l'ocytocine (Griffante C. et al, 2005). Malheureusement, chez le rat, ces deux composés ont été testés principalement sur les effets centraux de l'activation des récepteurs V1b, à savoir sur le contrôle de l'axe Hypothalamo-Hypophysaire-Surrénalien (HHS), la dépression ou encore l'agressivité et l'anxiété.

### **3. Internalisation et désensibilisation**

L'évènement le plus précoce de la désensibilisation des RCPG est la phosphorylation soit par des sérine/thréonine kinases des RCPG (GRK : G protein-coupled receptor kinase), des tyrosine kinases ou soit par des protéines kinases activées par un second messenger (PKA, PKC) (Lefkowitz R.J. et al, 1998). L'analyse des séquences peptidiques des trois récepteurs a montré qu'ils présentaient tous des sites de phosphorylations sérines/thréonines au niveau des boucles intracellulaires. Contrairement aux récepteurs V2 qui présentent uniquement un motif pour les GRK, les récepteurs de type V1 présentent également des motifs PKC. La GRK5 semble être la principale kinase intervenant dans la désensibilisation des récepteurs (Innamorati G. et al, 1998a). Ces phosphorylations peuvent soit altérer directement le couplage entre RCPG et protéines G soit favoriser la translocation de protéines cytosoliques découplantes, les  $\beta$ -arrestines, vers les récepteurs. Il s'agit des arrestines 2 pour les récepteurs V1 et des arrestines 1 et 2 pour le récepteur V2 (Oakley R.H et al, 1999 ; Berrada K et al, 2000). Le complexe récepteur-arrestine favorise ensuite l'interaction avec la clathérine, molécule du manteau de la vésicule d'endocytose. Une fois dans les endosomes, les RCPG ont un devenir variable, soit ils sont recyclés, soit ils sont dirigés vers les lysosomes et dégradés. Pour le récepteur V1a, la perte de fixation de la vasopressine conduira à son ré-adressage membranaire 10 minutes après stimulation par la vasopressine (Fishman J.B. et al, 1985). En revanche, le récepteur V2 ne retourne pas rapidement à la membrane plasmique lié au fait que le phosphate ajouté par les protéines kinases reste fixé. Seule sa déphosphorylation (environ 3 heures) conduira à son recyclage membranaire (Bowen-Pidgeon D. et al, 2001 ; Innamorati G. et al, 1999, 1998b). Pour le récepteur V1b, le recyclage membranaire est lié à la présence d'un motif bien particulier de deux résidus lysines entourés par des résidus hydrophobes. Toutes mutations dans ces résidus inhibent intégralement son adressage membranaire (Robert J. et al, 2005). Dans une expérience visant à déterminer l'internalisation des récepteurs V1b, sur une lignée cellulaire tumorale adénohypophysaire AtT20, Pena A. et ses collaborateurs ont montré que l'internalisation du récepteur V1b survenait rapidement après 6 minutes de stimulation par la vasopressine ou un agoniste spécifique (d(Leu<sup>4</sup>-Lys<sup>8</sup>)AVP) (Pena A. et al, 2007a).



## **IV. Localisation des récepteurs et fonctions biologiques de la vasopressine**

### **1. Localisation**

Les récepteurs V2 sont essentiellement exprimés au niveau du rein, notamment dans le canal collecteur et également dans la branche large ascendante de l'anse de Henle (Lolait S.J., 1992 ; Mutig K. et al, 2007). Des récepteurs V2 extrarénaux ont également été mis en évidence dans l'oreille interne où ils favorisent la translocation d'AQP2 et dans le poumon fœtal et adulte où la vasopressine joue un rôle important en réduisant la sécrétion des fluides pulmonaires notamment à la naissance (Cassin S. et Perks A.M., 1993 ; Perks A.M. et al, 1993 ; Hooper S.B. et al, 1993 ; Fay M.J. et al, 1996 ; Jonhson M.D. et al, 2006). Ces récepteurs sont également retrouvés sur les cellules endothéliales qui, sous l'action de la vasopressine, libèrent de l'oxyde nitrique ce qui induit une vasodilatation (Hirsch A.T. et al, 1989 ; van Lieburg A.F. et al, 1995). Enfin la vasopressine à forte doses, 10 à 30 fois plus fortes que celles induisant un effet antidiurétique, augmente le taux circulant du facteur de coagulation VIII, du facteur de Von Willebrand et de l'activateur du plasminogène (Mannucci P.M. et al, 1977 ; Bichet D.A. et al, 1988).

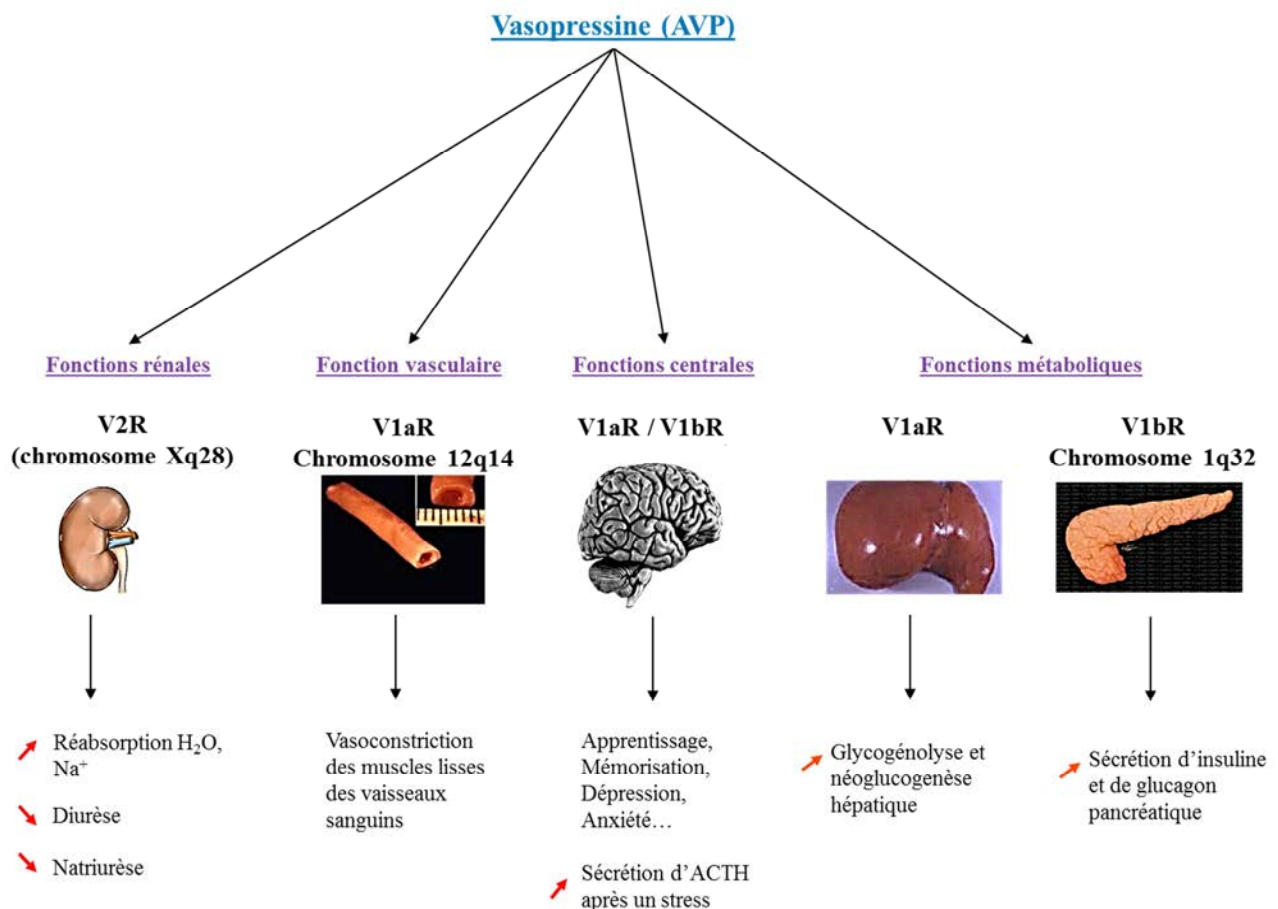
Inversement au récepteur V2, le récepteur V1a dispose d'une expression tissulaire quasi-ubiquitaire. Dans le système nerveux central (Tribollet E. et al, 1999), on le retrouve entre autres dans le septum, le cortex cérébral, l'hippocampe ou encore l'hypothalamus. Au niveau périphérique, le récepteur est présent dans le foie (Howl J. et al, 1991), les muscles lisses vasculaires (Yazawa H. et al, 1996), le rein (Arpin-bott M.P. et al, 1999), le tissu adipeux (Aoyagi T. et al, 2007) ou encore la zone corticale de la glande surrénale (Grazzini E. et al, 1999). L'effet de la vasopressine sur ces organes est évoqué ci-après. Via ce récepteur exprimé dans les plaquettes, la vasopressine favorise l'agrégation plaquettaire (Launay J.M., 1987 ; Manning M. et Sawyer W.H., 1989).

Tout comme le récepteur V1a, le récepteur V1b a une expression tissulaire relativement large au moins chez le rat. Au niveau du système nerveux central, le récepteur est présent dans le bulbe olfactif, le septum, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet (Antoni F.A., 1984 ; Lolait S.J. et al, 1995b). Les récepteurs V1b sont impliqués dans la sécrétion d'ACTH et interviennent dans le contrôle de nombreuses fonctions neurobiologiques (mémoire, comportement social, reproduction, thermorégulation (Born J., 1998 ; Richmond C.A. et al, 2003 ; Roth J. et al, 2004 ; Kelly A.M. et Goodson J.L., 2014).

Au niveau périphérique, on le retrouve dans le pancréas, la partie médullaire de la glande surrénale, le thymus, le cœur, les poumons, la rate, l'utérus, le rein et l'hypophyse (De Keyzer Y. et al, 1994 ; Lolait S.J. et al, 1995b ; Grazzini E. et al, 1996 ; Hernando F. et al, 2001 ; Folny V. et al, 2003).

## 2. Fonctions biologiques de la vasopressine

La vasopressine est une hormone multifonctionnelle liée à la présence de ses récepteurs aussi bien au niveau du système nerveux central qu'en périphérie. La fonction biologique de la vasopressine dépendra du type de récepteurs stimulé et de sa localisation. Le **schéma 10** ci-dessous résume brièvement l'ensemble des fonctions décrites de la vasopressine. Dans cette sous-partie, je discuterai du rôle de la vasopressine en condition de stress ainsi que de ces fonctions rénale et cardiovasculaires. Le rôle de la vasopressine dans l'homéostasie glucidique est présenté en partie 3.



**Schéma 10 : Les fonctions biologiques de la vasopressine**

Identification de certaines fonctions connues de la vasopressine dans le système nerveux central et au niveau périphérique.

### **a. Rôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien**

#### **✓ Au niveau central**

La vasopressine joue un rôle prépondérant dans l'activité de l'axe HHS impliqué dans la réponse au stress mais aussi dans le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines (Vale W. et al, 1981 ; Aguilera G. et al, 1983 ; Antoni F.A., 1993). Rappelons que la CRH et la vasopressine, synthétisées dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, stimulent en synergie la sécrétion de l'ACTH (Gaillard R.C. et al, 1984 ; Tilbrook A.J. et Clarke I.J., 2006 ; Aguilera G. et al, 2008). L'ACTH libérée dans le sang agit à son tour pour stimuler la sécrétion de glucocorticoïdes par la corticosurrénale (corticostérone chez le rongeur et cortisol chez l'homme) qui eux-mêmes stimulent la production de catécholamines par la médullosurrénale. La vasopressine a également été identifiée comme facteur stimulant la sécrétion de CRH (McCann S.M. et Brobeck J.R., 1954). L'importance de la vasopressine dans cet axe a été mise en valeur par le fait que l'inactivation génique du récepteur de la CRH conduit à une augmentation de la concentration plasmatique de vasopressine suggérant un rôle compensatoire de la vasopressine afin de maintenir des niveaux basaux d'ACTH et une activité de l'axe HHS stable (Brudieux R. et al, 1986 ; Muller M.B. et al, 2000). Confirmé par de récents travaux, la sécrétion d'ACTH, induite par la vasopressine, est réalisée par l'intermédiaire du récepteur V1b adénohypophysaire (Jard S. et al, 1986 ; Serradeil- Le Gal C. et al, 2002b ; Tanoue A. et al, 2004). Par ailleurs toutes les manœuvres (chirurgicales, pharmacologiques ou génétiques) conduisant au blocage de la production de vasopressine ou à l'inactivation des récepteurs V1b induisent une réduction des taux d'ACTH et de glucocorticoïdes dans des conditions de stress (De Goeij D.C. et al, 1991 ; Ma X.M. et al, 1997 ; Roper J.A. et al, 2010, 2011 ; Spiga F. et al, 2009 ; Zelena D. et al, 2009 ; Roberts E.M. et al, 2011). Cela témoigne que les effets vasopressinergiques ne sont pas compensés par la CRH ou encore par l'ocytocine (Scheuer D.A. et Bishop V.S., 1996).

#### **✓ Au niveau surrénalien**

Bien que la vasopressine soit majoritairement synthétisée dans l'hypothalamus, Nussdorfer G.G. a démontré une synthèse dans d'autres organes avec les organes géniteurs, le thymus, le pancréas et les surrénales (Nussdorfer G.G., 1996). Dans ces dernières, il a été montré que la vasopressine était synthétisée par les cellules chromaffines de la médulla, était sécrétée dans les conditions basales et sous l'action de l'acétylcholine et pouvait exercer une action autocrine et paracrine (Ravid R. et al, 1986 ; Hawthorn J. et al, 1987 ; Nussdorfer G.G.,

1996 ; Gallo-Payet N. et Guillon G., 1998 ; Fujiwara Y. et al, 2007). Dans le cortex où seuls les récepteurs V1a sont exprimés, la vasopressine augmente l'activité mitogénique de la zone glomérulée (Mazzocchi G. et al, 1993), stimule la production de glucocorticoïdes et de l'aldostérone chez les rongeurs, les animaux domestiques et l'homme (Hensen J. et al, 1988 ; Perraudin V. et al, 1993 et 2006 ; Birumachi J. et al, 2007). Dans la médulla, la vasopressine stimule, via les récepteurs V1b, la sécrétion des catécholamines (Armando I. et al, 1989 ; Grazzini E. et al, 1998 ; Itoh S. et al, 2006). Des récepteurs V1a ont également été trouvés dans les cellules non-parenchymateuses telles que la paroi des vaisseaux sanguins de la médulla (Gallo-Payet N. et Guillon G., 1998).

### **b. Rôle sur la fonction rénale**

La principale fonction de la vasopressine est son action antidiurétique. Via ses récepteurs V2 situés sur la face basolatérale des cellules principales du canal collecteur (CC), la vasopressine participe au mécanisme de concentration urinaire par trois actions distinctes : 1) elle augmente la perméabilité à l'eau de la membrane apicale du CC en favorisant l'adressage et l'insertion luminale des AQP2. La mise en place de ces pores permet la diffusion passive de l'eau suivant le gradient osmotique existant entre la lumière tubulaire et l'interstitium périrubulaire (Nielsen S. et al, 1995 ; Knepper M.A., 1997 ; Inoue T. et al, 2001), 2) elle stimule la réabsorption de sodium dans le CC cortical et médullaire externe en stimulant l'activité du canal sodium épithélial ENaC. Cette action sur la réabsorption de sodium entraîne une augmentation de la réabsorption d'eau (Schafer J.A. et Troutman S.L., 1990 ; Ecelbarger C.A. et al, 2000 ; Nicco C. et al, 2001) et 3) elle augmente la réabsorption de sodium dans la branche large ascendante en stimulant l'activité de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  et la perméabilité à l'urée dans la partie terminale du CC, en activant les transporteurs d'urée UT-A1. Ces effets sont essentiels au maintien du gradient osmotique cortico-médullaire et à la capacité du rein à réabsorber de l'eau dans le CC. Parallèlement à ces actions V2-dépendantes, la vasopressine a aussi des effets rénaux via ses récepteurs V1a. L'activation des récepteurs V1a luminaux, situés sur la face apicale des cellules intercalaires du CC, atténue les effets antidiurétiques V2-dépendants (Nonoguchi H. et al, 1995 ; Ledderhos C. et al, 1995 ; Bankir L., 2001a ; Carmosino M. et al, 2007 ; Perucca J. et al, 2008b ; Bankir L. et al, 2010). Via ses récepteurs V1a et V2 situés dans différents types cellulaires du rein, la vasopressine intervient aussi dans le contrôle de la filtration glomérulaire (Bouby N. et al, 1996 ; Aoyagi T. et al, 2008) et du débit sanguin médullaire (Cowley A.W. Jr, 2000).

Outres ces effets fonctionnels, comme beaucoup d'autres hormones, des effets prolifératifs de la vasopressine ont été rapportés mais essentiellement *in vitro* et sur des tissus exprimant le récepteur V1a comme les cellules mésangiales (Ganz M.B. et al, 1988 ; Tahara A. et al, 2012). Cependant *in vivo*, des taux élevés de vasopressine stimulent l'hypertrophie et la prolifération cellulaire des segments de néphrons particuliers et exprimant le récepteur V2 et important dans le mécanisme de concentration urinaire à savoir les branches larges ascendantes et les canaux collecteurs de la zone interne de la médullaire externe (Kriz W. et Bankir L., 1982 ; Bouby N. et al, 1985 ; Alonso G. et al, 2009).

### **c. Rôle sur la pression artérielle**

Comme indiqué précédemment, la vasopressine a d'abord été identifiée il y a presque un siècle par ses effets presseurs. L'action de la vasopressine sur la pression artérielle est liée à la présence des récepteurs V1a sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins. Même si l'administration aiguë de vasopressine conduit à une augmentation de la pression artérielle (Harland D. et al, 1989 ; Oikawa R. et al, 2010), la contribution des récepteurs V1a dans l'homéostasie de la pression artérielle, chez les sujets sains, n'est pas évidente. Ceci probablement parce que la concentration de vasopressine nécessaire pour induire une réponse vasculaire est nettement supérieure à la concentration circulante et à la concentration requise pour une action rénale (Montani J.P. et al, 1980 ; Crowley A.W. Jr et al, 1983 ; Liard J.F., 1984 ; Share L., 1988). De plus l'effet hypertenseur induit par les propriétés vasoconstrictrices de la vasopressine est compensé par la bradycardie et la vasodilatation artériolaire induites par le baroréflexe (Koshimizu T.A. et al, 2006 ; Oikawa R. et al, 2007). Les relations entre vasopressine et baroréflexe sont complexes. L'activation du baroréflexe stimule la neurosécrétion de vasopressine mais en retour la vasopressine exerce un rétrocontrôle négatif sur ce réflexe. Par ailleurs la vasopressine peut agir sur la pression artérielle soit directement en favorisant la rétention sodée rénale (Fernandes S. et al, 2002) soit indirectement en stimulant l'axe HHS et le système rénine-angiotensine-aldostérone (van Zwieten P.A., 1988 ; Tsai R.C. et al, 1990 ; Aoyagi T. et al, 2008).

Globalement, la vasopressine ne joue pas de rôle majeur dans la régulation à court terme de la pression artérielle exceptée dans certaines conditions comme l'hémorragie, l'hypovolémie ou l'hypotension (Jordan J. et al, 2000 ; Wenzel V. et al, 2004 ; Treschan T.A. et Peters J., 2006).

## **Partie 2 : Métabolisme glucidique et diabète**

En 1850, Claude Bernard a créé le concept fondamental de la constance du milieu intérieur définie, quelques années plus tard, sous le nom d'Homéostasie. Ce terme se définit par la capacité, pour l'organisme, de maintenir ses paramètres physico-chimiques à des valeurs constantes malgré les contraintes qu'il subit.

Chez l'homme, la glycémie doit être régulée très finement de telle sorte qu'elle soit maintenue en alentour de  $5,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  ( $1 \text{ g.l}^{-1}$ ) afin de garantir un apport énergétique constant aux différents tissus. Trois organes vont principalement intervenir dans la régulation de l'homéostasie glucidique : le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. D'autres organes participent également à l'augmentation ou la diminution de la glycémie. C'est le cas, notamment du rein et de l'intestin qui sont capables de produire ce substrat énergétique. En période postprandiale (juste après un repas), l'augmentation du taux de glucose dans le sang entrainera l'activation de l'utilisation et du stockage de glucose sous forme de glycogène dans les muscles squelettiques et le foie, et sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. En revanche, en période de jeûne, la glycémie est maintenue stable par une augmentation de la production de glucose essentiellement au niveau du foie et, dans une moindre mesure, par le rein et l'intestin. Les flux entrants et sortants de glucose sont contrôlés par des régulations nerveuses et hormonales.

Dans cette partie, nous verrons l'ensemble des mécanismes intervenant dans l'utilisation du glucose par les cellules afin de maintenir leur fonctionnement suivi par les voies métaboliques permettant le stockage du glucose. Enfin, nous discuterons des voies participant à la production endogène de glucose.

# **I. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition postprandiale.**

## **1. La captation de glucose**

Bien avant que le glucose puisse être utilisé ou stocké par les différents organes, ce dernier doit être assimilé en franchissant la membrane plasmique cellulaire. Toutefois, le glucose est une molécule hydrophile, polaire et de taille relativement importante l'empêchant de traverser librement la membrane plasmique des cellules. Son entrée dans la cellule sera alors facilitée par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques classés en deux catégories (Baly D.L. et Horuk R., 1988 ; Bell G.I. et al, 1990) : les co-transporteurs glucose/sodium (SGLT) et les transporteurs au glucose (GLUT).

### **✓ Les co-transporteurs glucose/sodium**

Les SGLT permettent le transport du glucose contre son gradient de concentration en couplant son entrée avec celle du sodium. Le taux de sodium entrant sera régulé par la présence d'une pompe ATPase  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  située sur la membrane basolatérale. Il s'agit donc de transporteurs actifs secondaires fonctionnant comme des symports. Chez l'homme, il a été décrit la présence de 5 membres de la famille des SGLT permettant le transport du glucose et autres hexoses (Wright E.M. et al, 2011). Ces co-transporteurs sont notamment exprimés au niveau de la membrane apicale des cellules absorbantes de l'intestin (entérocytes) et au niveau des cellules épithéliales du tubule proximal du rein. Parmi ces membres, on retrouve le SGLT1 qui est présent dans les deux organes alors que le SGLT2 est présent uniquement dans le rein. Cependant, la réabsorption rénale de glucose se fait principalement par l'intermédiaire du SGLT2.

### **✓ Les transporteurs GLUTs**

Contrairement aux SGLT, les GLUT sont des transporteurs permettant le transport du glucose suivant son gradient de concentration par une diffusion facilitée ne nécessitant pas d'énergie. Cependant, certains d'entre eux peuvent transporter d'autres sucres tels que le galactose et le fructose. Bien qu'il ait été généralement considéré que ces transporteurs induisaient l'entrée du glucose dans la cellule, ils sont aussi capables de le faire sortir : une particularité favorable au foie pour la régulation de la glycémie. A ce jour, 14 membres de cette famille ont pu être identifiés (GLUT1 à GLUT14) et leur expression varie en fonction de l'espèce, du type

tissulaire et cellulaire et ils disposent d'une sensibilité variable pour les stimuli (Uldry M. et Thorens B., 2004). Un certain nombre d'articles, paru au cours des 10 dernières années, font état des connaissances actuelles sur certains de ces transporteurs résumées ci-dessous (Cheeseman C., 2008 ; Carruthers A. et al, 2009 ; Doblado M. et Moley K.H., 2009).

<b>GLUTs</b>	<b>Localisation</b>	<b>Hexoses transportés</b>	<b>Particularité</b>	<b>Références</b>
<b>GLUT1 (SCL2A1)</b>	Ubiquitaire (ex : cerveau, hématies, muscles, tissu adipeux, foie, pancréas)	Glucose, mannose, galactose, glucosamine, 3-O-methylglucose et 2-deoxy-d-glucose	Responsable du transport basal maintenant un niveau énergétique stable ( $K_m = 1-2$ mM)	Baldwin J.M. et al, 1981 ; Mueckler M. et al, 1985 ; Kahn B.B. et al, 1992 ; Rhoads D.B., 1994 ; Maher J.C. et al, 2005
<b>GLUT2 (SCL2A2)</b>	Cellules $\beta$ pancréatiques, pôle basolatérale des entérocytes intestinaux, cellules épithéliales rénales, cerveau et foie	Principalement Glucose mais aussi galactose mannose et fructose	Equilibre des concentrations extra- et intracellulaire en condition physiologique ou d'hyperglycémie, augmentation de l'absorption intestinale de glucose, favorise la sécrétion d'insuline ou de glucagon et l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques ( $K_m \approx 17$ mM)	Thorens B., 1992 ; Uldry M. et al, 2002 ; Marty N. et al, 2007 ; Kellett G.L. et al, 2008 ; Leturque A. et al, 2009



<b>GLUTs</b>	<b>Localisation</b>	<b>Hexoses transportés</b>	<b>Particularité</b>	<b>Références</b>
<b>GLUT3 (SCL2A3)</b>	Cellules neuronales, lymphocytaires, macrophages, les plaquettes, foie, rein et cœur	Glucose, maltose, xylose, déhydroascorbate, mannose et galactose	Captation de glucose et métabolisme (km $\approx$ 1,5 mM)	Colville C.A. et al, 1993 ; Gould G.W. et Holman G.D., 1993 ; Simpson I.A. et al, 2008
<b>GLUT4 (SCL2A4)</b>	Adipocytes, muscles squelettiques et cœur	Glucose déhydroascorbate et glucosamine	Captation de glucose insulino-dépendant, contrôle rapide de la glycémie par stimulation de la glycogénèse et lipogénèse (km 2-5 mM)	Cushman S.W. et Wardzala L.J., 1980 ; Holman G.D. et al, 1990 ; Zhao F.Q. et Keating A.F., 2007 ; Karnieli E. et Armoni M., 2008
<b>GLUT5 (SLC2A5)</b>	Pôle apical des cellules épithéliales intestinales A moindre mesure dans le rein, cerveau, tissu adipeux et muscles	Principalement le fructose mais aussi le glucose	Régulé suivant la disponibilité en substrat, le rythme journalier et autres facteurs Absorption intestinale de fructose (Km $\approx$ 10 mM)	Shepherd P.R. et al, 1992 ; Douard V. et Ferraris R.P., 2008

**Tableau B : Classification des différents transporteurs aux hexoses appartenant à la famille GLUT**

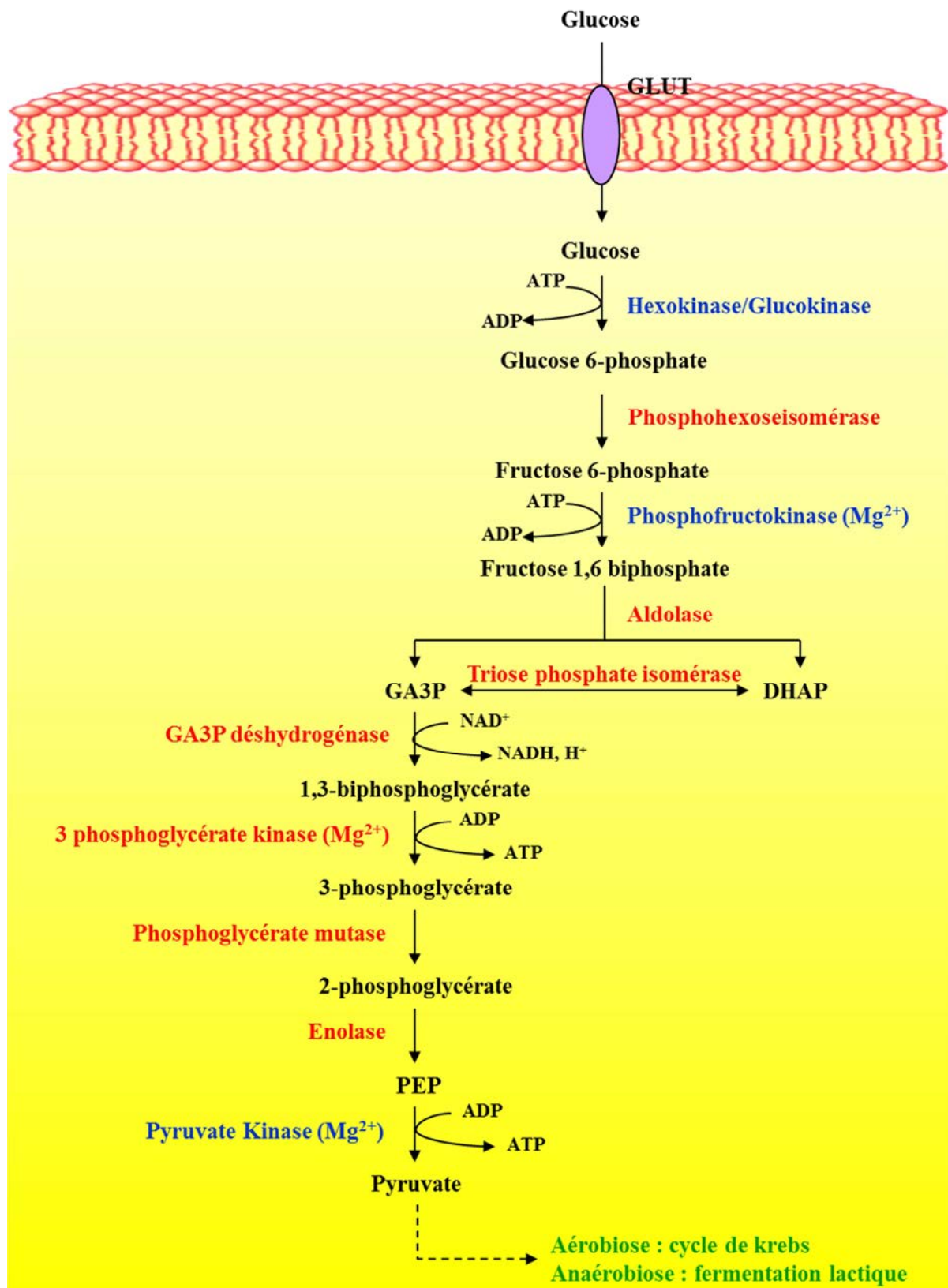
Actuellement, il a pu être recensé 14 membres de la famille des transporteurs facilités au glucose. Parmi ces membres, seuls les GLUT1 à 5 ont été bien décrits dans la littérature. Très peu de choses ont été découvertes pour les GLUT6 à 14 à l'exception des GLUT8 et 9 probablement en relation avec leur expression hépatique (Schmidt S. et al, 2009 ; Preitner F. et al, 2009).

## **2. Le devenir du glucose**

Une fois que le glucose est entré dans les cellules, celui-ci va être métabolisé de différentes façons en fonction des besoins de l'organisme. Les voies métaboliques de la glycolyse et des pentoses phosphates permettront la production d'énergie, de coenzymes réduites et autres intermédiaires alors que celles de la glycogénèse et de la lipogénèse *de novo* favoriseront le stockage du glucose sous forme de glycogène et la synthèse de tryglycérides, respectivement. Quelque soit la voie empruntée par le glucose, celui-ci doit être transformé en glucose 6-phosphate.

### **a. La voie de la glycolyse**

Cette voie métabolique correspond en l'oxydation du glucose pour former du pyruvate. Cette oxydation progressive conduira à la production d'énergie sous forme d'ATP et de divers substrats en vue du stockage du glucose par la glycogénèse et la production de tryglycérides par la lipogénèse. Tous les tissus sont capables d'utiliser le glucose comme source d'énergie. Effectivement, une molécule de glucose oxydée donnera naissance à deux molécules de pyruvate, d'ATP et de coenzymes réduites sous forme de NADH,  $H^+$ . Ainsi, la glycolyse permet la production directe d'énergie sous forme d'ATP et indirecte sous forme de NADH,  $H^+$  qui sera réoxydé en  $NAD^+$  par la chaîne respiratoire mitochondriale, en condition aérobie et par la fermentation lactique en condition anaérobie. L'ATP sera utilisée pour des réactions endergoniques et le pyruvate sera entièrement oxydé dans la matrice mitochondriale par le cycle de Krebs. Les points clés liés à cette voie sont le taux de glucose capté par la cellule via les GLUT, la phosphorylation du glucose sur son carbone 6 par l'hexokinase, la conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate par la phosphofructokinase et la formation de pyruvate par la PhosphoEnolPyruvate kinase. Ces trois enzymes ont une régulation allostérique et leur synthèse est sous l'influence de l'insuline aussi bien dans le foie que dans le muscle (Printz R.L et al, 1993 ; Wu C et al, 2004) (**Schéma 11: La glycolyse**).



**Schéma 11 : La glycolyse**

L'entrée du glucose par le transporteur GLUT conduit à son oxydation en glucose 6-phosphate et son intégration dans la voie de la glycolyse. Celle-ci formera au final du pyruvate qui rentrera dans le cycle de Krebs. GA3P : GlycérAldéhyde 3-Phosphate ; DHAP : DiHydroxyAcétone Phosphate ; PEP : PhosphoEnolPyruvate.

### **b. La voie des pentoses phosphates**

Le pourcentage de glucose passant dans la voie des pentoses phosphates varie de 5 à 30% en fonction des tissus. Le flux maximal étant atteint dans les tissus capables de produire des acides gras et stéroïdes (foie, tissus adipeux ou encore la glande surrénale) et dans les hématies. Bien que son rôle soit de produire du Ribose 5-phosphate pour parfaire la synthèse des acides nucléiques, la voie des pentoses phosphates est également très utile pour générer le NADH,  $H^+$  (Bosca L. et al, 1985). La production de cette coenzyme réduite permet la synthèse des acides gras mais elle joue également un rôle antioxydant protégeant ainsi contre le stress oxydatif. Il est important de noter qu'au travers de cette voie, des substrats de la glycolyse sont produits, à savoir du fructose 6-phosphate et du GA3P. La voie des pentoses phosphates va permettre de dérouter l'oxydation du glucose, par la voie classique de la glycolyse, afin de produire des dérivés de la synthèse d'acides nucléiques et des coenzymes réduites.

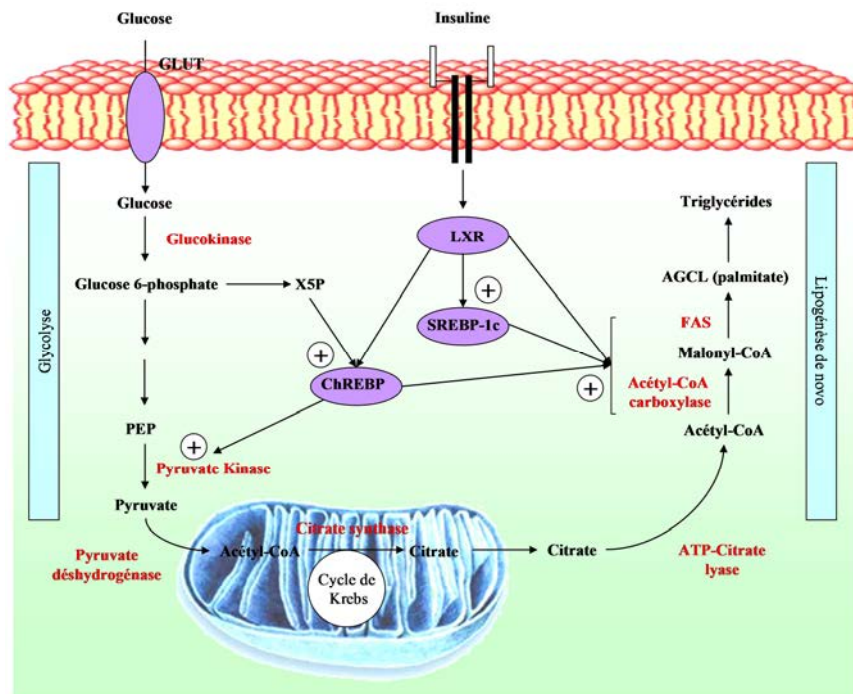
### **c. Stockage du glucose en glycogène : la glycogénèse**

La glycogénèse est le processus de synthèse du glycogène par l'assemblage de molécules de glucose. Cette forme de stockage se produit uniquement dans le foie et le muscle squelettique. La quantité de glycogène dépendant de la taille de l'organe, la glycogénèse est plus importante dans le foie que dans le muscle squelettique. Cependant, à l'échelle de l'organisme, la masse totale des muscles est nettement supérieure à celle du foie. Ainsi, environ 65% du glycogène corporel est stocké dans les muscles. Dans cette voie métabolique et avant l'assemblage des molécules de glucose, le glucose sera transformé en glucose 6-phosphate par l'hexokinase/glucokinase. L'enzyme clé de cette voie métabolique est la glycogène synthase qui est activée par l'insuline.

### **d. Glucose et lipogénèse *de novo***

La synthèse de lipides *de novo* est une voie métabolique qui conduit à la conversion d'un excès de carbohydrates en acides gras lesquels sont estérifiés avec le glycérol 3-phosphate pour former des triglycérides. Cette voie métabolique du glucose a lieu à la fois dans le tissu adipeux et le foie et lorsque les stocks en glycogène sont saturés (Hellerstein M.K. et al, 1996). Les différentes étapes conduisant à la formation de triglycérides sont illustrées ci-

dessous (**Schéma 12 : Lipogénèse *de novo* et régulations transcriptionnelles**). L'activité de cette voie est fortement dépendante de l'état nutritionnel et il est maintenant bien établi que la transcription des enzymes lipogéniques nécessite de l'insuline et du glucose pour être pleinement réalisée (Foufelle F. et Ferré P., 2002). En effet, l'insuline régule non seulement le flux entrant de glucose par les GLUT (tissu adipeux) mais aussi l'activité des enzymes lipogéniques tels que la FAS (Fatty Acide Synthase) et l'Acétyl-CoA Carboxylase (tissu adipeux et foie) (Clarke S. et Jump D., 1993 ; Girard J. et al, 1994). Dans le foie, le pyruvate issu de la glycolyse peut être oxydé dans le cycle de Krebs mais aussi favoriser la lipogénèse (Hers H.G. et Hue L., 1983). Les gènes codant pour les enzymes de la lipolyse sont sous le contrôle de facteurs de transcription : SREBP-1c (Sterol Response Element Binding Protein 1c) en réponse à l'insuline et ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) en réponse au glucose (Foufelle F. et Ferré P., 2002 ; Dentin R. et al, 2005). Les récepteurs X du foie (LXR : Liver X Receptor) sont également des facteurs de transcription activés par un ligand, appartenant à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux, et ils sont importants dans la régulation de la lipogénèse. LXR est un régulateur essentiel du contrôle transcriptionnel de SREBP-1c par l'insuline (Chen G. et al, 2004), des enzymes lipogéniques et de ChREBP (Decaux J.F. et al, 1989 ; Cha J.Y. et al, 2007).



**Schéma 12 : Lipogénèse *de novo* et régulations transcriptionnelles**

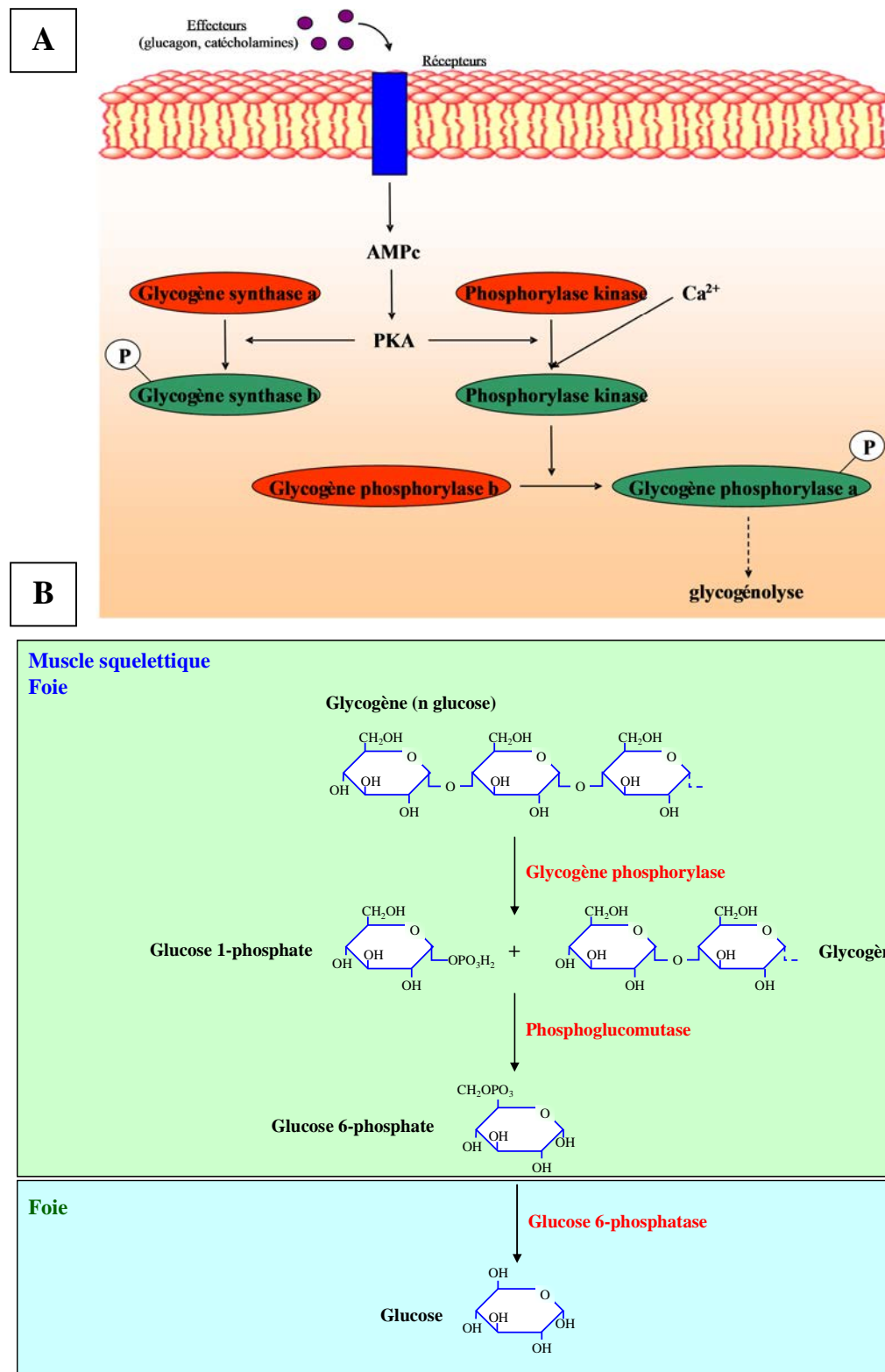
La conversion du glucose en acides gras, par l'intermédiaire de la lipogénèse, est sous le contrôle nutritionnel dont l'insuline et le glucose en sont des déterminants. AGCL : Acides Gras à Chaine Longue ; ChREBP : Carbohydrate Responsive Element Binding Protein ; LXR : Liver X Receptor ; PEP : PhosphoEnolPyruvate ; SREBP-1c : Sterol Response Element Binding Protein 1c.

## **II. Régulation de l'homéostasie glucidique en condition de jeûne**

La production endogène de glucose permet de maintenir la glycémie entre les repas et en période de jeûne. Cette production fera intervenir deux voies métaboliques : la glycogénolyse et la néoglucogénèse. Toutefois, seuls le foie, le rein et l'intestin sont capables de produire du glucose car ils sont les seuls organes à disposer de la glucose 6-phosphatase permettant la production du glucose à partir du glucose 6-phosphate.

### **1. La voie de la glycogénolyse**

Il est connu que tous les organes sont capables d'utiliser le glucose comme source d'énergie. Mais seuls le foie et le muscle squelettique sont capables de stocker ce glucose sous forme de glycogène. Ainsi, dans certaines conditions (jeûne et activité physique), ces organes pourront produire du glucose à partir du glycogène. La production de glucose par l'intermédiaire du glycogène dans le foie et le muscle correspond à la glycogénolyse. Il est toutefois important de noter que seul le foie sera capable de relarguer le glucose dans la circulation sanguine afin de réguler la glycémie. Le muscle squelettique produira du glucose pour sa propre consommation énergétique, en aucun cas, le glucose ne sortira du muscle pour réguler la glycémie. La cassure des molécules de glycogène pour produire au final du glucose fait appel à l'action de 3 enzymes et est pleinement effective dans le foie, le rein et l'intestin qui sont les seuls organes à disposer de la glucose 6-phosphatase, contrairement au muscle. La voie de la glycogénolyse s'oppose à la voie de la glycogénèse. Ainsi, lorsqu'une voie est active, l'autre est réprimée. Ceci est rendu possible par la régulation inverse des glycogènes phosphorylase et synthase, respectivement (**Schéma 13 : la glycogénolyse**). La glycogène synthase est activable sous l'action de l'insuline en condition postprandiale pour réduire la glycémie. Au cours du jeûne ou d'une activité physique, le taux d'insuline sera réduit alors que la sécrétion de glucagon ou de catécholamine activera la glycogène phosphorylase. Au cœur de ces deux enzymes, on retrouve la PKA qui est activatrice de la glycogène phosphorylase et inhibitrice de la glycogène synthase. Elle est activée indirectement par l'AMPc, le calcium et directement par le 5'AMP et inhibée par le glucose, la glucose 6-phosphatase et l'ATP.



**Schéma 13 : La glycogénolyse**

A) Suite à l'augmentation du taux d'AMPc, la protéine kinase A (PKA) activée entraîne la phosphorylation de la phosphorylase kinase, qui phosphoryle et active à son tour la glycogène phosphorylase. Il s'agit de la première enzyme de la glycogénolyse. B) La dégradation du glycogène conduit à la production de glucose 6-phosphate directement utilisé pour produire de l'énergie (muscle) ou transformé en glucose (foie) pour l'homéostasie glucidique.

## **2. La voie de la néoglucogénèse**

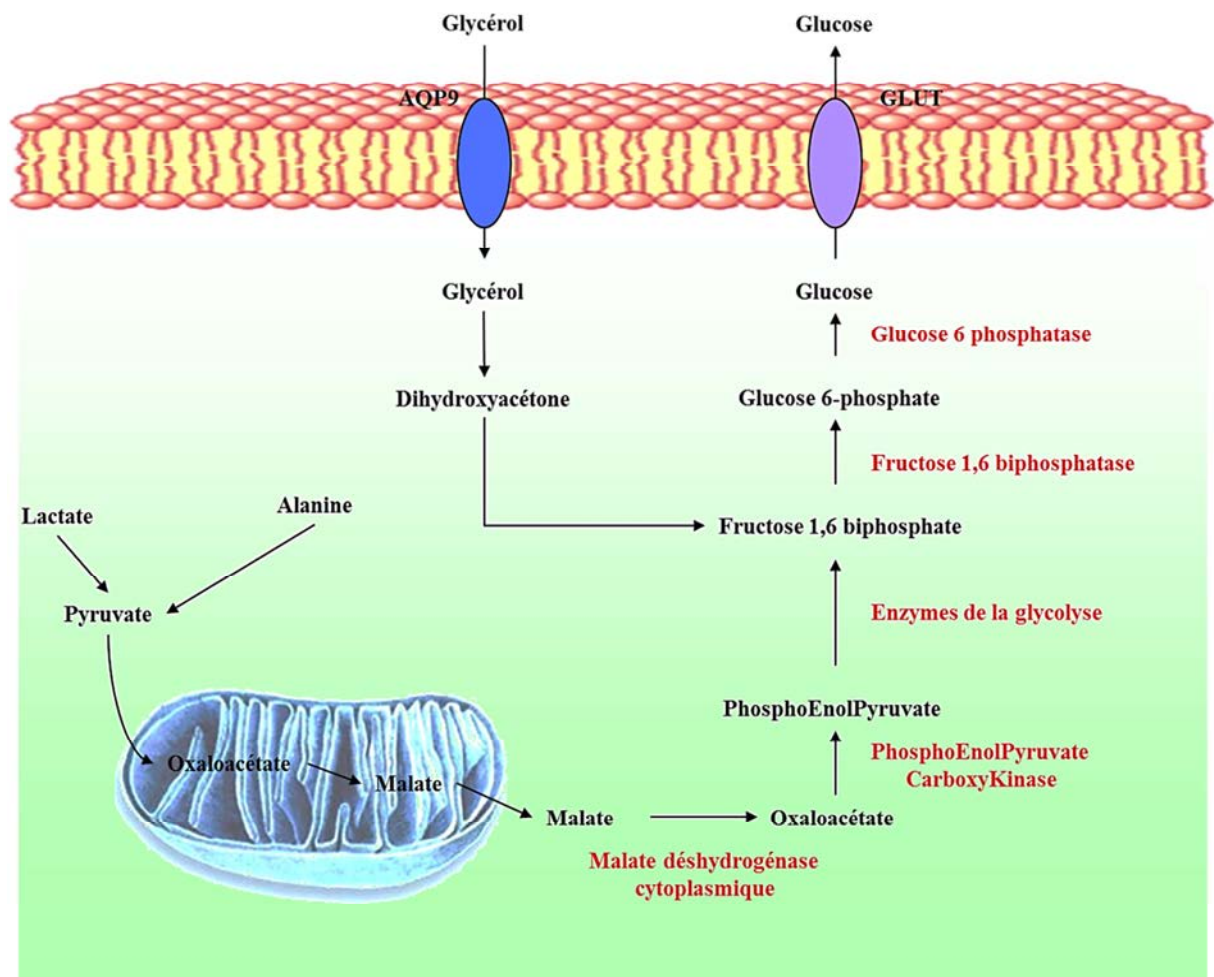
En condition de jeûne, le glucose sera en premier lieu produit par la glycogénolyse pour assurer, en outre, le métabolisme énergétique du cerveau. Mais le glycogène étant une source épuisable, les voies de la néoglucogénèse vont permettre l'utilisation d'autres substrats pour former du glucose. Ces substrats (acides aminés glucoformateurs, lactate ou glycérol) sont produits par d'autres tissus périphériques et captés par le foie.

- ✓ Les acides aminés glucoformateurs proviennent du catabolisme protéique des muscles. La transamination des acides aminés va permettre la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs qui a lieu dans la mitochondrie. L'acide aminé le plus important pour la production de glucose est l'alanine qui est convertie en pyruvate.
- ✓ Le lactate est un acide produit principalement dans les muscles à l'issue de la glycolyse anaérobie. Après sa captation par le foie, il sera transformé en pyruvate par la lactate déshydrogénase conduisant à la néoglucogénèse (cycle de CORI).
- ✓ Le glycérol est un alcool provenant de la lipolyse adipocytaire. Le passage adipocyte/sang s'effectue par l'intermédiaire de l'aquaglycéroporine 7 (AQP7) et le passage sang/foie est réalisé par l'aquaglycéroporine 9 (AQP9). Le glycérol est converti en dihydroxyacétone phosphate qui, avec le glycéraldéhyde 3-phosphate, entrera dans la néoglucogénèse. Cette voie nécessite deux molécules de glycérol.

La néoglucogénèse, à partir du pyruvate, fait intervenir un ensemble de 12 réactions enzymatiques commençant dans la mitochondrie et se terminant dans le cytoplasme. Bien qu'elle partage de nombreuses réactions communes avec la glycolyse, trois réactions cytoplasmiques en sont bien spécifiques faisant intervenir la PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase (PEPCK), la Fructose-1,6 biphosphatase (F-1,6 BPase) et la glucose 6-phosphatase (G6Pase). On peut alors globalement diviser cette voie en 5 étapes avec une étape mitochondriale et 4 étapes cytoplasmiques (**Schéma 14 : La néoglucogénèse**).

Cette voie métabolique est sous le contrôle allostérique du fructose 2,6-biphosphate qui inhibe la F-1,6 BPase. Comme pour la glycogénolyse, le glucagon, les catécholamines exercent une régulation endocrinienne par l'intermédiaire de l'AMPc. Les glucocorticoïdes jouent également un rôle activateur en agissant sur la transcription des gènes de la PEPCK, de la F-1,6 BPase et de la G6Pase.





#### Schéma 14 : La néoglucogénèse

Cette voie permet la production de glucose à partir d'a.a glucoformateurs (ex : alanine), de lactate ou de glycérol lorsque des besoins énergétiques sont nécessaires.

### **3. Importance de la production extra-hépatique de glucose**

Le foie est généralement considéré comme le principal organe producteur de glucose en condition postabsorptive et au cours du jeûne chez les mammifères (Bergman R.L. et Mittelman S.D., 1998). Au début des années 1990, il a été reconnu que le rein pouvait jouer un rôle important, dans ces conditions nutritionnelles, chez le rat, le chien et l'homme (Minassian C. et Mithieux G., 1994 ; Cersosimo E. et al, 1994 ; Ekberg K. et al, 1999). Plus récemment, l'intestin a été montré être le troisième organe capable de contribuer à la production endogène de glucose en condition de jeûne et dans le diabète chez le rat (Croset M. et al, 2001). Les études réalisées chez l'homme et le rat ont montré, en condition postabsorptive, que la production rénale de glucose représente environ 25% de la production totale et sa capture est environ de 20% sur la captation totale de glucose (Stumvoll M. et al, 1995 ; Pillot B. et al, 2009). Après 24 heures de jeûne chez le rat, la production rénale de glucose correspond environ à 45% de la production totale et ce taux de production est maintenu si le jeûne se prolonge (Mithieux G. et al, 2006). Ces travaux réfutent alors l'idée que le rein joue un rôle mineur dans la production endogène de glucose. Des données expérimentales suggèrent également que les glucocorticoïdes et l'AMPc soient deux facteurs responsables de la stimulation à long terme de la néoglucogénèse rénale observée dans les tubules proximaux de rats diabétiques (Sparks J.D. et al, 1998) par stimulation de l'activité des enzymes clés de la néoglucogénèse (Longshaw I.D. et al, 1972 ; Iynedjian P.B. et al, 1975). L'AMPc stimule la transcription de la F-1,6 BPase et de la PEPCK (El-Maghrabi M.R. et al, 1991 ; Longshaw I.D. et Pogson C.I., 1972). Les auteurs concluent que le glucagon, dans les conditions du diabète, pourrait être indirectement responsable de l'induction de la néoglucogénèse rénale.

Après 48 heures de jeûne, la production intestinale de glucose représente environ 20% de la production totale de glucose, chez le rat (Croset M. et al, 2001). Cette production est réalisée principalement par l'utilisation de glutamine comme substrat faisant de la glutaminase et de la PEPCK deux enzymes majeurs contrôlant la néoglucogénèse intestinale (Rajas F. et al, 2000 ; Mithieux G., 2001). Le glycérol, le lactate et l'alanine interviennent très peu ou pas du tout dans la néoglucogénèse intestinale (Croset M. et al, 2001). Après un jeûne plus long de 72h, la participation de l'intestin dans la production endogène de glucose pourrait représenter 35% de la production totale. Au cours de la période postprandiale et pendant un jeûne modéré (12h chez l'homme et 6h chez le rongeur), la production endogène de glucose fera intervenir principalement le foie par l'intermédiaire de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse.

Cependant, si le jeûne se prolonge, la production hépatique de glucose diminue et est prise en charge par le rein et l'intestin. L'importance de l'intestin et du rein dans le maintien de la production de glucose a été confirmée au cours d'une phase anhépatique lors de la transplantation du foie chez l'homme (Battezzati A. et al, 2004) et dans un modèle de souris KO pour le gène de la glucose 6-phosphate (Mutel E. et al, 2011a).

#### **4. Importance de la production de glucose pour l'organisme**

Le maintien d'une glycémie à une valeur normale est essentiel pour l'organisme et en particulier pour le système nerveux central car le cerveau ne peut ni synthétiser ni stocker la quantité de glucose nécessaire pour son fonctionnement (Cryer P.E. et Gerich J.E., 1985). Le maintien de la glycémie dépend de la balance entre la production endogène de glucose et son utilisation. Chez un individu normal, l'homéostasie glucidique s'établit en particulier sous le contrôle des hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon (Gerich J.E., 1993). L'insuline, seule hormone hypoglycémisante, permet de réduire la glycémie lorsque celle-ci est trop élevée, et à l'inverse le glucagon augmente la production de glucose quand la glycémie baisse. Cette action du glucagon permet de maintenir l'homéostasie glucidique en période postabsorptive et de jeûne et de maintenir un bon fonctionnement cérébral. Le risque d'un jeûne trop prolongé, pour un individu, est l'hypoglycémie. Cette hypoglycémie survient lorsque la concentration plasmatique en glucose est inférieure ou égale à  $54 \text{ mg.dl}^{-1}$  (3 mM) et elle est responsable d'une neuroglucopénie s'accompagnant de différents symptômes progressant de la transpiration et palpitations à un dysfonctionnement cognitif et des convulsions. En fonction de la sévérité et de la durée de l'état hypoglycémique, elle peut conduire au coma voire même le décès. Elle pourrait soudainement conduire à une mort cardiaque par induction soit d'une ischémie soit une arythmie. Chez l'enfant, l'hypoglycémie chronique conduit à des altérations intellectuelles avec troubles de l'apprentissage et de la mémorisation (Kalra S. et al, 2013).

Ainsi, l'ensemble des voies métaboliques intervenant dans la production de glucose permettent ainsi d'empêcher l'hypoglycémie ayant des répercussions, plus ou moins graves, sur l'organisme.

### **III. Régulations hormonales et nerveuses de l'homéostasie glucidique**

#### **1. L'importance des hormones dans le contrôle du métabolisme glucidique**

##### **a. Rôle de l'insuline**

L'insuline est considérée comme la principale hormone pancréatique permettant de réguler finement la glycémie. Elle favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et stimule le stockage des lipides dans le tissu adipeux. L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante et elle est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas.

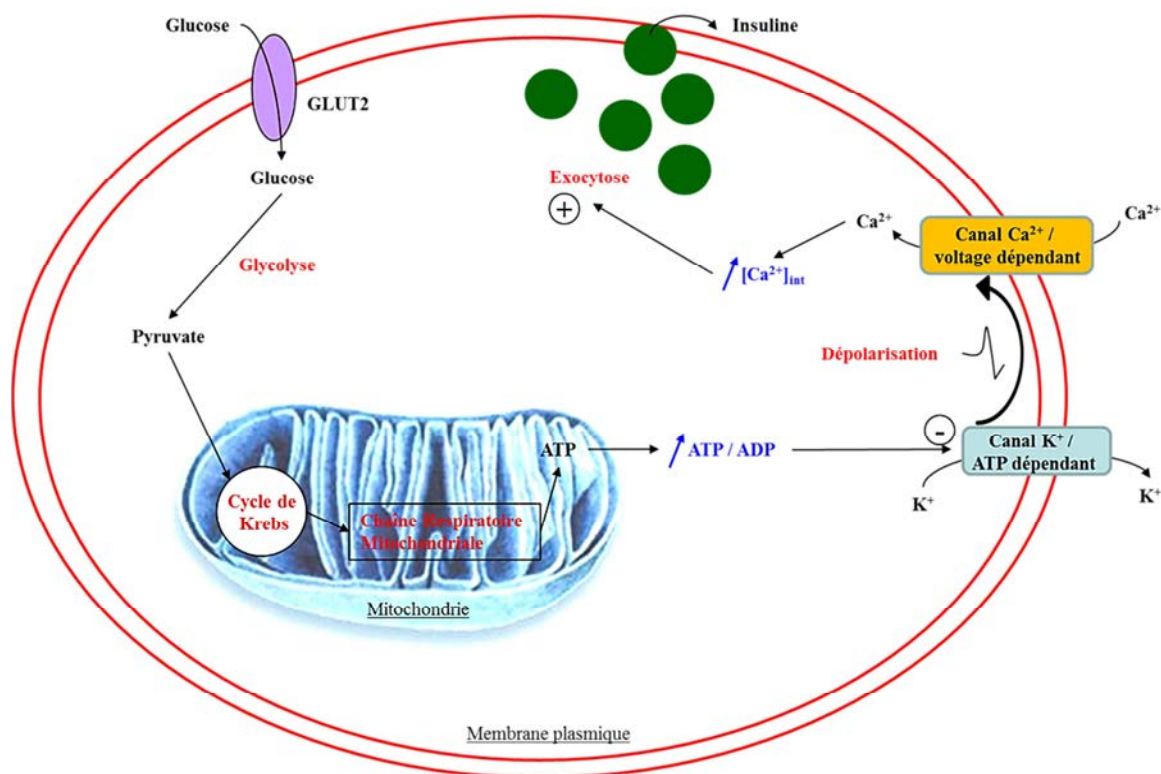
##### **Le glucose, stimulus de l'insulino-sécrétion pancréatique :**

A la surface des cellules  $\beta$  pancréatiques est exprimé un transporteur au glucose non insulino-dépendant : GLUT2. Comme décrit précédemment, ce transporteur permet le transfert facilité du glucose depuis le compartiment sanguin vers l'intérieur de la cellule  $\beta$ . C'est la détection directe du glucose par le pancréas qui conduira à une augmentation de la sécrétion calcium-dépendante de l'insuline. La première étape consiste en la métabolisation du glucose entrant afin d'augmenter le rapport ATP/ADP. Le taux élevé d'ATP intracellulaire entraînera la fermeture du canal  $K^+$  sensible à l'ATP par fixation de l'ATP sur la protéine Kir 6.2 (Cook D.L. et al, 1984). La résultante est une dépolarisation membranaire de la cellule  $\beta$  suivie par l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants (Satin L.S. et Smolen P.D., 1994). L'augmentation intracellulaire de calcium conduira à l'exocytose des vésicules contenant l'insuline par l'intermédiaire du complexe SNARE (Henquin J-C., 2000) (**Schéma 15 : Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules  $\beta$  pancréatiques**).

##### **Voies de signalisation de l'insuline :**

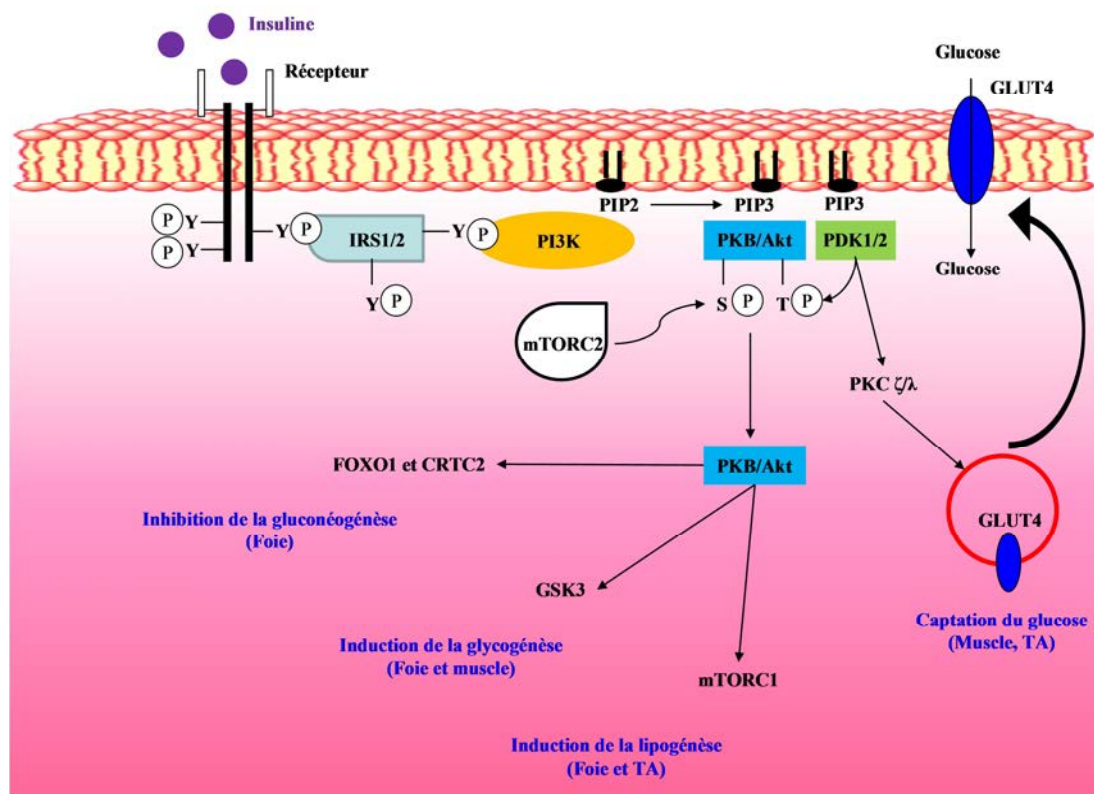
Une fois sécrétée dans la circulation systémique, les effets anaboliques de l'insuline résultent de sa liaison sur un récepteur spécifique situé, prioritairement, à la surface cellulaire de trois tissus cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux. Ce récepteur dispose d'une activité tyrosine kinase permettant son autophosphorylation suivie par la phosphorylation, sur des résidus tyrosines, de protéines substrats (IRS : Insulin Receptor Substrates) et de protéines adaptatrices de la famille SHC (src homologous and collagen protein) (van Obberghen E. et

al, 2001). Les deux voies majeures de la signalisation sont celles de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) impliquée dans les effets métaboliques, et la voie des MAP kinases impliquée dans les processus de croissance, prolifération et de différenciation cellulaires. Le **schéma 16** illustre la voie de signalisation passant par PI3K. La transmission du signal insulinémique dans la cellule met en jeu les IRS1 et IRS2 (White M.F., 2002). Par l'intermédiaire de cette signalisation, l'insuline est capable d'induire la translocation du transporteur GLUT4 à la surface membranaire des cellules musculaires et adipocytaires (Saltiel A.R. et Kahn C.R., 2001 ; Bryant N.J. et al, 2002). Dans le foie, la voie insulinémique activera directement un ensemble de protéines et facteurs de transcriptions impliqués dans les voies métaboliques du glucose.



**Schéma 15 : Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules  $\beta$  pancréatiques**

Stimulation de la sécrétion d'insuline induite par l'entrée de glucose, l'inactivation des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP et l'augmentation intracellulaire de calcium.



**Schéma 16 : Voie de signalisation de l'insuline sur ses tissus cibles**

La stimulation du récepteur à l'insuline conduit à l'activation de la voie PI3K inductrice des effets métaboliques de l'insuline sur ses organes cibles (Alessi D.R. et Downes C.P., 1998 ; Frojdo S.H. et al, 2009).

CRTC2 : CREB Regulated Transcription Coactivator 2 ; FOXO1 : Forkhead Box Protein 1 ; GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3 ; IRS : Insulin Receptor Substrates ; mTORC 1/2 : mammalian Target Of Rapamycin 1/2 ; PDK1/2: Phosphoinositide-Dependent Kinase 1/2 ; PKB/Akt : Protein Kinase B ; PKC  $\zeta/\lambda$  : atypical Protein Kinase C ( $\zeta/\lambda$ ) ; PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase ; S : Sérine ; T : Thréonine.

### Régulation du métabolisme glucidique par l'insuline :

Des études, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que les FKHR (Forkhead-related protein) comme FOXO1 étaient capables de se lier aux éléments de réponse à l'insuline (IRE : Insulin Response Element) de la PEPCK et de la G6Pase (Durham S.K. et al, 1999 ; Tang E.D., 1999) et de favoriser la transcription de ces enzymes. L'activation de la voie signalétique de l'insuline entrainera l'activation de la PKB/Akt qui en retour phosphoryle FKHR. FKHR phosphorylé n'est alors plus capable de se fixer aux IREs et il est transloqué dans le cytoplasme où il sera ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Rena G. et al, 1999 ; Biggs III W.H. et al, 1999). Outre les effets de l'insuline sur FOXO1, l'insuline est également capable d'induire la phosphorylation de CRTC2 (anciennement TORC2) qui ne peut alors plus se fixer sur les promoteurs hépatiques de la PEPCK et de la G6Pase (Dentin R. et al,

2008). L'activation de la voie insulinémique dans le foie conduit à l'inactivation de la G6Pase par l'intermédiaire de FOXO1 et de la PEPCK par CRTC2. Outre l'inhibition sur les gènes de la néoglucogénèse, la signalisation par l'insuline conduit également à la phosphorylation de la kinase GSK3. Cette dernière étant alors inactivée, la glycogène synthase reste active (pas de phosphorylation) et par conséquent induit la glycogénèse (Cross D.A. et al, 1995). Le complexe 1 de la cible de la rapamycine (mTORC1) stimule la lipogénèse en activant le facteur de transcription SREBP1-c qui, comme montré en schéma 12, induit la transcription des gènes de la lipogénèse (Chakrabarti P. et al, 2010 ; Laplante M. et Sabatini D.M., 2010 ; Li S. et al, 2010).

En période postabsorptive, le taux élevé d'insuline conduit à une augmentation du taux de fructose 2,6-biphosphate suite à la déphosphorylation de la phosphofructokinase II. Le taux élevé de fructose 2,6-phosphate conduit à l'activation de la phosphofructokinase I et l'inhibition de la F-1,6 BPase. Ainsi, en augmentant la production de fructose 2,6-phosphate, l'insuline stimule la glycolyse et inhibe la néoglucogénèse (El-Maghrabi M.R. et al, 2001).

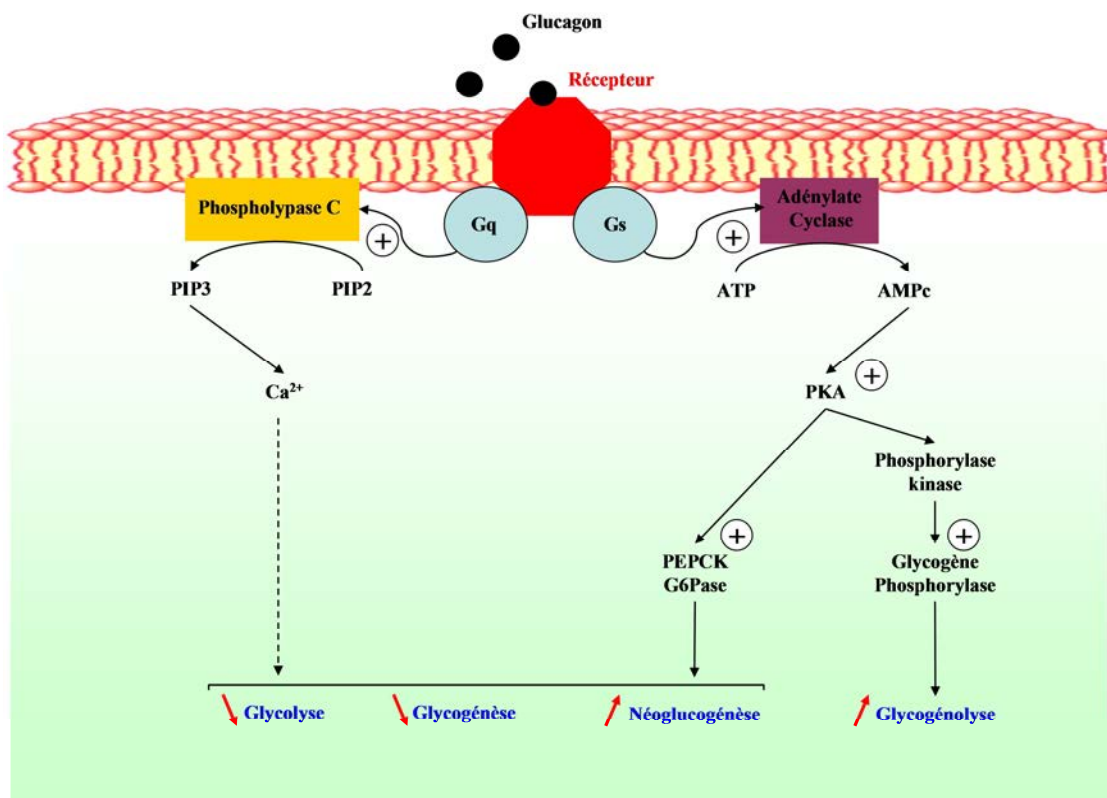
### **b. Rôle du glucagon**

Le glucagon est sécrété par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans du pancréas et il est un régulateur clé de l'homéostasie glucidique. L'administration exogène de glucagon conduit à une augmentation de la glycémie aussi bien chez l'homme que le rongeur (Young A.A. et al, 1993 ; Hvidberg A. et al, 1994) résultant de la stimulation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. Le glucagon en se fixant sur son récepteur RCPG, associé à deux types de protéines G, stimule deux voies signalétiques :

- ✓ Lié à la protéine Gs, le glucagon entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, induisant une augmentation du taux intracellulaire d'AMPC et par conséquent, comme pour le récepteur V2 de la vasopressine, une stimulation de la PKA (Burcelin R. et al, 1996).
- ✓ Lié à la protéine Gq, le glucagon favorise la voie de la PLC soit, comme pour les récepteurs de type V1 de la vasopressine, une augmentation du taux intracellulaire de calcium (Wakelam M.J. et al, 1986). Par cette voie de signalisation, le glucagon diminuerait l'activité de la pyruvate kinase (enzyme de la glycolyse).

D'un point de vue général, les effets du glucagon sont inverses à ceux de l'insuline. Le glucagon induit la phosphorylation de la phosphorylase kinase et de la glycogène synthase (activation de la glycogénolyse, inhibition de la glycogénèse, **Schéma 13**), de la G6Pase et de la PEPCK (activation de la néoglucogénèse, **Schéma 14**) (Christ B. et al, 1988 ; Roach P.J.,

1990 ; Bollen M. et al, 1998). Le glucagon permet également de phosphoryler la phosphofructokinase II entrainant une réduction du taux de fructose 2,6-biphosphate et par conséquent lève l'inhibition exercée sur la F-1,6 BPase. In fine, il favorise la néoglucogénèse (Okar D.A. et Lange A.J., 1999). En même temps, le glucagon inhibe l'activité de la phosphofructokinase I et par conséquent inhibe la glycolyse. Il a également été démontré, au cours d'un long jeûne, que le glucagon favorisait la néoglucogénèse rénale et intestinale (Mutel E. et al, 2011b). (Schéma 17 : Rôles physiologiques du glucagon)



**Schéma 17 : Rôles physiologiques du glucagon**

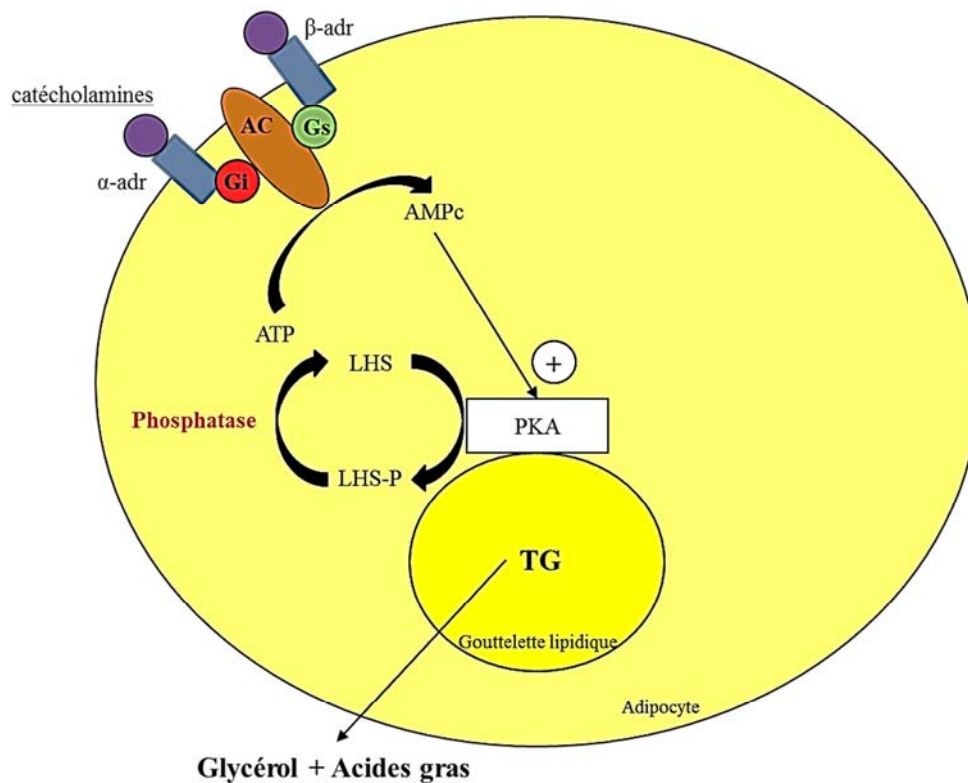
Suite à la stimulation de son récepteur, le glucagon favorise la production de glucose en faisant intervenir deux voies de signalisation : la voie PKA et la voie PLC.



### c. Rôle des catécholamines

Les effets des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sur le métabolisme glucidique font intervenir principalement les récepteurs  $\beta$  adrénergiques (Träger K. et al, 2001). Toutefois, les récepteurs  $\alpha$  adrénergiques hépatiques ont été démontrés comme impliqués dans les effets hyperglycémisants (Chu C.A. et al, 2000). En condition physiologique, le rôle des catécholamines, dans l'homéostasie glucidique, est de maintenir un flux de substrats énergétiques dans les organes. Il en résulte une augmentation de la glycolyse (pour la production d'ATP) et de la production de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Träger K. et Radermacher P., 2003). Les catécholamines conduisent également à une inhibition de la glycogénèse induite par l'insuline (Laurent D. et al, 1998). L'ensemble de ces effets fait suite, comme pour le glucagon, à l'activation de la voie PKA.

Les catécholamines ont également été décrites comme intervenants de la lipolyse avec des effets opposés suivant une stimulation  $\alpha$ - ou  $\beta$ -adrénergique, les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques étant des inducteurs de la lipolyse. Contrairement à beaucoup d'espèces, les catécholamines sont les seules hormones à nettement stimuler la lipolyse chez l'homme. Ces hormones peuvent agir sur le tissu adipeux par l'intermédiaire de la circulation générale (principalementadrénaline) ou par le système sympathique (noradrénaline). Leur action est médiée par trois récepteurs  $\beta$ -adrénergiques distincts mais fait principalement intervenir le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique chez l'homme et le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique chez l'animal. La voie de signalisation médiée par les catécholamines sur la lipolyse est présentée sur le **schéma 18**. En condition postabsorptive (jeûne de 12h) et en condition de jeûne (> 16h), l'oxydation des lipides peut représenter 70% de la dépense énergétique corporelle. Les acides gras libres représentent le substrat énergétique principal pour le foie, le cortex rénal, le muscle squelettique et le muscles cardiaque au repos. Le jeûne est accompagné d'une augmentation progressive de l'activité lipolytique et du taux d'acides gras libres avec une baisse de l'insulinémie et une augmentation de l'action lipolytique des catécholamines. L'augmentation de l'action des catécholamines est attribuée à une élévation du nombre de récepteur  $\beta$ -adrénergiques. En quittant le tissu adipeux, les acides gras circulent dans le plasma sous forme liée à l'albumine et pourront être utilisé par les muscles squelettiques (oxydation), le foie (oxydation et synthèse de tryglycérides) mais également par le tissu adipeux pour être re-estérifiés en tryglycérides. Cette action lipolytique, dans ces conditions physiologiques et notamment au cours du jeûne très prolongé, permet d'épargner le glucose musculaire (Large V. et al, 2004).



#### Schéma 18 : Induction de la lipolyse par les catécholamines

Les catécholamines induisent la lipolyse par stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ceci entraîne l'activation de la PKA qui phosphoryle la lipase hormono-sensible. L'activation de cette enzyme hydrolyse les triglycérides en glycérol et acides gras. AC : adénylate cyclase ; LHS : lipase hormono-sensible ; TG : triglycérides (modifié d'après Large V. et al, 2004 Diabetes & Metabolism).

#### d. Rôle des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont sécrétés au niveau de la glande surrénale au cours du stress. Comme le glucagon et les catécholamines, ils augmentent la production de glucose durant la période postprandiale. Ces hormones agissent principalement en régulant le taux d'expression des gènes des enzymes (PEPCK et G6Pase) de la néoglucogénèse, après fixation sur leur récepteur nucléaire. Cependant, la fixation du récepteur aux glucocorticoïdes sur les promoteurs néoglucogéniques n'est pas suffisante pour induire la transcription. En effet, d'autres facteurs sont importants pour stimuler les effets glucocorticoïdes. Parmi ces autres facteurs, on retrouve FOXO1, HNF-1 et 4 (Lin B. et al, 1998 ; Stafford J.M. et al, 2001 ; Wolfrum C. et al, 2004) ainsi que PGC-1 $\alpha$  qui intervient principalement dans la transcription du gène de la G6Pase. Outre les effets stimulateurs sur la production endogène de glucose, il a été montré, *in vitro* sur des cellules  $\beta$  pancréatiques, que les glucocorticoïdes inhibaient

l'insulino-sécrétion (Lambillotte C. et al, 1997). Au niveau musculaire, ils sont impliqués dans l'installation de l'insulino-résistance avec augmentation de la glycogénolyse (Weinstein S.P. et al, 1998). Au niveau du tissu adipeux, les données sont quelques peu controversées. Cependant, des études *in vitro* ont démontré que les glucocorticoïdes jouaient un rôle lipolytique (Peckett A.J. et al, 2011). En plus d'un effet direct, l'action lipolytique adipocytaire aurait pour effet d'augmenter indirectement l'accumulation de triglycérides dans le foie (Koliwad S.K. et al, 2009 ; Gray N.E. et al, 2012).

## **2. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux**

Les cellules  $\beta$  pancréatiques sont sous le contrôle de stimuli hormonaux et neuronaux. Ceci a été démontré par la présence d'un large spectre de récepteurs à la surface des cellules. Parmi les récepteurs, on retrouvera notamment ceux des hormones responsables de l'effet incrétine (GLP-1, GIP) sécrétées par les entérocytes ou encore celui du glucagon exerçant un effet paracrine sur les cellules  $\beta$ . Le pancréas peut recevoir deux types de stimulation nerveuse encadrant une innervation parasympathique et une innervation sympathique. L'innervation parasympathique entrainera une réponse stimulatrice de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cet effet passe par l'intermédiaire des récepteurs de l'acétylcholine, PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide), GRP (Gastrin Releasing Peptide) ou encore VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). L'innervation sympathique aura un effet inverse suite à l'activation des récepteurs noradrénergique, NPY (NeuroPeptide Y) et de la galanine (Ahren B, 2000). Les systèmes nerveux parasympathique et sympathique stimulent également la sécrétion de glucagon. Le système sympathique en activant la sécrétion adrénérergique surrénalienne conduit à une sécrétion de glucagon par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta_2$  adrénérergiques alors que l'inhibition de l'insulino-sécrétion est effectuée par les récepteurs  $\alpha_2$  adrénérergiques (Thorens B., 2010).

Comme le pancréas, le foie dispose d'une innervation parasympathique et d'une innervation sympathique que sont toutes deux impliquées dans la régulation du métabolisme glucidique. Au niveau du système nerveux central, l'hypothalamus et plus particulièrement le noyau ventromédian, semble être la structure encéphalique prépondérante dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Les nerfs intra-hépatiques contiennent des neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline) et des neuropeptides (GRP, NPY, VIP, galanine...). Le système sympathique stimule la glycogénolyse et la néoglucogénèse alors que le système parasympathique favorise la glycogénèse et la glycolyse (Uyama N. et al, 2004). En effet, une

stimulation de la voie sympathique (noyau hypothalamique ventromédian) entraîne une augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase et de la PEPCK ainsi qu'une diminution de celle de la pyruvate kinase (Shimazu T. et Ogasawara S., 1975 ; Shimazu T., 1981). En revanche, la stimulation de la voie parasympathique (noyau hypothalamique latéral) active la glycogénèse par activation de la glycogène synthase (Shimazu T. et Amakawa A., 1975).

#### **IV. Le diabète**

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par l'incapacité du pancréas à sécréter de l'insuline ou par l'incapacité pour les organes cibles à répondre à l'insuline. La résultante est une concentration sanguine accrue en glucose : hyperglycémie. On distinguera principalement deux types de diabète avec le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques des îlots de Langerhans. Les cellules  $\beta$  étant responsable de la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de la glycémie, ce type de diabète correspond alors à une insulino-pénie liée à une perte de production d'insuline. Bien qu'il puisse affecter une personne à n'importe quel âge, il apparaît généralement chez les enfants et les adolescents. Toute personne atteinte par le diabète de type 1 nécessite alors une administration journalière d'insuline pour corriger l'hyperglycémie. Le diabète de type 2, contrairement au diabète de type 1, n'est pas relié à une perte de production d'insuline mais davantage à une diminution de l'action de l'insuline sur les organes cibles. Cette baisse d'action insulinémique est identifiée sous l'appellation insulino-résistance. Dans un premier temps, le pancréas sécrètera suffisamment d'insuline pour corriger au mieux la glycémie. Au bout d'un certain temps, il sera incapable de suivre la montée accrue de la glycémie. Il ne pourra alors pas produire suffisamment d'insuline pour maintenir la glycémie à un niveau normal. A terme et comme pour le diabète de type 1, une insulino-pénie et une destruction  $\beta$  pancréatique s'installent.

Dans la présente partie, on s'intéressera principalement au diabète de type 2 qui représente environ 90% de tous les cas de diabète. Après avoir fait le point sur l'épidémiologie et l'étiologie du diabète de type 2, nous traiterons de sa pathogénèse liée à la résistance à l'insuline.

## **1. Epidémiologie du diabète de type 2**

Le diabète est l'une des maladies la plus commune au monde et il est devenu la 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> cause de mortalité dans la plupart des pays riches avec 5 millions de décès en 2013. Il est également l'un des problèmes de santé majeur de ce siècle. D'après la Fédération Internationale du Diabète, 285 millions de personnes étaient atteintes d'un diabète en 2010 ce qui représente environ 7% de la population mondiale. En 2013, le nombre de personnes diabétiques a atteint 382 millions soit une augmentation d'environ 100 millions de nouveau cas en l'espace de trois ans. Sur les 382 millions de cas diabétiques estimés en 2013, 175 millions d'entre eux sont atteints d'un diabète dit « non-diagnostiqué » (Beagley J. et al, 2013). Ceci est lié au fait que les personnes avec un diabète non-diagnostiqué ont très peu de symptômes (propre au diabète) durant les premières années ou bien que les symptômes ne sont pas reconnus comme appartenant à cette pathologie. Cette même fédération qualifie l'ampleur de la maladie comme une véritable pandémie et sa progression est considérable. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé estime que le taux de personnes atteintes devrait s'élever à 440 millions d'ici à 2030, voire 592 millions d'ici à 2035 d'après la Fédération Internationale du Diabète. En plus des personnes diabétiques et non-diagnostiqués, il existe des cas d'intolérance au glucose ou de glycémie à jeun altérées caractérisant la phase de pré-diabète. En 2013, on estime le nombre de personnes avec une intolérance au glucose à environ 316 millions et ce nombre pourraient atteindre 471 millions d'ici à 2035. La plupart de ces données correspondent essentiellement au diabète de type 2 qui représente environ 90% de tous les cas de diabète.

## **2. Etiologie du diabète de type 2**

Parmi les facteurs de risques du diabète, on peut distinguer les facteurs de risques purement génétiques et les facteurs dits « environnementaux », bien que les études récentes mettent l'accent sur les interactions gènes-environnement.

### **a. Les facteurs génétiques**

Bien que l'augmentation actuelle de la prévalence au diabète de type 2 soit principalement attribuée au changement du mode de vie, certains déterminants génétiques contribuent à la susceptibilité d'apparition de cette pathologie. En effet, le risque de développer cette forme de

diabète est de 40% si l'un des parents est diabétique et de 70% si les deux parents en sont porteurs. Le développement de technologie de génotypage à haut débit et de logiciels de calculs et de statistiques ont permis une avancée remarquable dans la recherche d'association gène/maladie. En conséquence, un grand nombre de loci ont été associés avec le diabète de type 2 ou ses caractéristiques (hyperglycémie, insulino-pénie, insulino-résistance) par l'intermédiaire d'études corrélationnelles. Parmi l'ensemble de ces loci, on retrouve ceux du TCF7L2 (facteur de transcription multigénique), de PPAR $\gamma$  (récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxyssomes), du canal KCNJ11 (canal rectifiant l'entrée de potassium), SLC30A8 (transporteur de Zinc), HHEX (facteur de transcription), IGF2BP2 (protéine de liaison à l'ARNm du facteur de croissance semblable à l'insuline) (Florez J.C. et al, 2006 ; Sladek R. et al, 2007 ; Saxena R. et al, 2007 ; Zeggini E. et al, 2007, 2008 ; Voight B.F. et al, 2010).

### **b. Les facteurs environnementaux**

#### **✓ Obésité, surpoids et prise alimentaire**

L'obésité et le surpoids sont liés en grande partie à un déséquilibre entre apports et dépenses énergétiques. Ce sont des facteurs de risque prépondérants dans l'apparition du diabète de type 2 mais également dans d'autres pathologies. Beaucoup de patients atteints d'un diabète de type 2 sont obèses et d'ailleurs, la proportion mondiale de personnes obèses explique largement l'augmentation de l'incidence et de la prévalence mondiale du diabète. Cependant, toutes les personnes obèses ne développent pas un diabète et inversement (Boden G., 2011). Le lien entre l'obésité et l'hyperglycémie a été démontré pour la première fois dans les années 1960 (Bagdade J.D. et al, 1967). L'influence de l'obésité n'est pas liée uniquement au niveau de sévérité de l'obésité mais également à la répartition des graisses. La graisse viscérale a été la plus associée avec le risque de développement d'un diabète de type 2 (Despres J.P. et al, 2001 ; Wahrenberg H. et al, 2005). Tous les mécanismes impliqués dans l'obésité n'ont pas été élucidés mais trois processus ont été reliés avec l'insulino-résistance et la prédisposition au diabète de type 2 : 1) la production élevée de cytokines et adipokines (TNF- $\alpha$ , résistine, protéine 4 liant le rétinol (RBP4), la réduction de production d'adiponectine (Deng Y. et Scherer P.E., 2010) ; 2) la déposition ectopique des graisses notamment autour du foie et probablement des muscles squelettiques (Larson-Meyer D.E. et al, 2011) et 3) le dysfonctionnement mitochondrial (Bournat J.C. et Brown C.W., 2010). Des sujets normoglycémiques et obèses présentent une augmentation dans la fonction et la masse des cellules  $\beta$

pancréatiques (Butler A.E. et al, 2003) alors que les sujets obèses et intolérants au glucose ont une perte de l'un ou l'autre (Kahn S.E. et al, 2006). Toutefois, la perte de fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques pourrait également s'expliquer par une déficience dans le gène Pdx1 (Leibowitz G. et al, 2001) qui code pour un facteur de transcription important pour le développement pancréatique et la maturation de ces cellules.

#### ✓ L'activité physique et la sédentarité

Un ensemble d'études ont démontré que les personnes pratiquant une activité physique régulière, sont moins sujettes à l'insulino-résistance, l'intolérance au glucose et au diabète de type 2 (Helmrich S.P. et al, 1991 ; Eriksson K.F. et Lindgarde F., 1991). De plus, l'activité physique permet d'éviter la progression vers un diabète de type 2 chez les sujets intolérants au glucose et réduit les complications liées au diabète chez les sujets ayant un diabète établi (Sherwin R.S. et al, 2004). Toutefois, cet effet bénéfique dépend de la fréquence, de l'intensité, du temps et du type d'activité pratiqué (Manson J.E. et al, 1991).

#### ✓ Le tabac

Plusieurs études ont montré que le tabac favorise l'insulino-résistance et le syndrome métabolique (Kong C. et al, 2001). Ce risque est d'autant plus fort que le nombre de cigarettes par jour et le nombre d'année de consommation est élevé (Kawakami N. et al, 1997 ; Willi C. et al, 2007).

### **c. Le syndrome métabolique**

La notion de syndrome métabolique est apparue en 1988 (Reaven G.M., 1988). La définition exacte de ce syndrome est l'objet d'un vif débat au sein des communautés scientifiques et médicales internationales. Il associe plusieurs symptômes parmi lesquels figurent l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'hypertension et l'obésité. La Fédération internationale du Diabète a proposé, en 2006, la définition suivante basée sur la possibilité de l'évaluer facilement en pratique clinique : le critère obligatoire de cette définition est l'obésité abdominale associée à deux des quatre paramètres suivants :

- ✓ Augmentation des triglycérides plasmatiques :  $> 1,7 \text{ mM}$  ( $150 \text{ mg.dl}^{-1}$ )
- ✓ Diminution du taux d'HDL-cholestérol :  $< 1,03 \text{ mM}$  ( $40 \text{ mg.dl}^{-1}$ ) chez l'homme,  $< 1,29 \text{ mM}$  ( $50 \text{ mg.dl}^{-1}$ ) chez la femme ou traitement en cours pour dyslipidémie

- ✓ Augmentation de la pression artérielle :  $>130$  mmHg en systolique,  $> 85$  mmHg en diastolique ou traitement en cours pour hypertension artérielle
- ✓ Augmentation de la glycémie à jeun :  $> 5,6$  mM ( $100$  mg.dl<sup>-1</sup>) ou diabète de type 2 diagnostiqué

Quelque soit la définition, il est admis que les patients présentant un syndrome métabolique ont un risque accru de développer des pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque et un diabète de type 2, tout ceci contribuant à la morbi-mortalité de ce syndrome (Lakka H.M. et al, 2002 ; Aguilar-Salinas C.A. et al, 2005).

### **3. La physiopathologie du diabète**

Les patients atteints d'un diabète de type 2 présentent un défaut d'action de l'insuline (insulino-résistance) qui se caractérise par : une augmentation de la production endogène de glucose, une diminution de la captation de glucose musculaire et adipocytaire, une augmentation de la lipolyse et une diminution de la glycogénèse.

#### **a. Etat de l'insulino-résistance**

##### **✓ Dans les muscles squelettiques**

Le muscle est un organe très sensible à l'insuline. La première action de l'insuline, en rapport avec la présence des transporteurs GLUT4, est de favoriser la captation de glucose. La captation musculaire de glucose représente 80% de la captation totale corporelle (Kelley D. et al, 1988 ; DeFronzo R.A., 2004) et est régulée par la glycolyse et la glycogénèse. DeFronzo R.A. et ses collaborateurs ont démontré, par l'utilisation d'un clamp euglycémique insulinémique, que le niveau de captation de glucose musculaire était largement diminué (environ 50%) chez des sujets obèses et non-obèses atteints d'un diabète de type 2 (DeFronzo R.A. et al, 1985). Cette diminution de captation de glucose a été corrélée avec une baisse d'expression de GLUT4 à la surface membranaire et une diminution de la glycogénèse (Zierath J.R. et al, 1996 ; Zisman A. et al, 2000).



#### ✓ Dans le tissu adipeux

Contrairement aux muscles, le tissu adipeux est responsable uniquement de 5% de la captation totale de glucose. Il joue un rôle très important dans le maintien de la glycémie en régulant la libération des acides gras libres issus des triglycérides stockés et en produisant des adipokines qui influencent la sensibilité à l'insuline dans le foie et les muscles (Groop L.C. et al, 1989 ; Boden G., 1997). Dans l'adipocyte, l'insuline augmente la captation des acides gras provenant des lipoprotéines en stimulant la lipoprotéine lipase (Wang H. et Eckel R.H., 2009) et inhibe la lipolyse par inactivation de la lipase hormono-sensible. Chez des sujets obèses ou diabétiques, l'activité anti-lipolytique de l'insuline est réduite suite à la résistance adipocytaire (Kovacs P. et Stumvoll M., 2005). L'augmentation de la lipolyse et donc du flux d'acides gras libres serait la cause et/ou aggraverait la résistance à l'insuline dans le foie et dans les muscles (Delarue J. et Magnan C., 2007).

#### ✓ Dans le foie

La résistance à l'insuline hépatique conduit à une augmentation de la production endogène de glucose qui est corrélée avec l'hyperglycémie à jeun (Boden G., 2002). L'augmentation accrue en acides gras libre est le facteur principal de l'augmentation de la production de glucose par l'intermédiaire de la néoglucogénèse mais d'autres facteurs jouent également un rôle avec l'augmentation du taux et de la sensibilité au glucagon et l'augmentation de précurseurs glucogéniques (lactate, glycérol, alanine) (Butler P.C. et Rizza R.A., 1991 ; Velho G. et al, 1996 ; Nordlie R.C. et al, 1999 ; Basu A. et al, 2000).

### **b. Les mécanismes cellulaires de la résistance à l'insuline**

Les événements cellulaires par lesquels l'insuline induit ses effets stimulateurs sur le métabolisme glucidique suite à sa fixation sur son récepteur présent à la surface de tous ses organes cibles sont résumés dans le **schéma 19 : Acides gras libres et insulino-résistance.**

#### ✓ Défaut dans la signalisation insulinémique : IRS et PI3K

La capacité de l'insuline à activer la phosphorylation de son récepteur et des IRS est légèrement réduite chez des sujets obèses et sévèrement altérée chez des sujets atteints d'un diabète de type 2 (Cusi K. et al, 2000). Des études, effectuées chez l'homme et le rongeur, ont montré que la perte d'activité des IRS était liée à leur phosphorylation au niveau des résidus sérines par l'intermédiaire de la PKC (Yu C. et al, 2002 ; Morino K. et al, 2005). Une

augmentation de l'activité de la PKC a été observée dans l'insulino-résistance et elle peut être induite par les lipides (Schmitz-Peiffer C. et al, 1997 ; Schmitz-Peiffer C. et Biden T.J., 2008). Les IRS peuvent également être déphosphorylées par des tyrosines phosphatases comme PTB1 (protein tyrosine Phosphatase 1B). La génération de souris KO pour PTP1B a révélé que les souris ne développaient pas de diabète de type 2 et d'obésité sous régime riche en graisse (Goldstein B.J. et al, 2000 ; Salmeen A. et al, 2000 ; Klamann, L.D. et al, 2000). L'activation de la PI3K est également très atténuée chez les sujets diabétiques (Kim Y-B. et al, 1999 ; Krook A. et al, 2000) et cette diminution est fortement corrélée avec une baisse de l'activité de la glycogène synthase. Le défaut d'induction de la transcription du gène de la PI3K, par l'insuline, est observé aussi bien dans le muscle que dans le tissu adipeux (Andreelli F. et al, 1999). Les mêmes observations ont pu être mises en évidence dans des modèles animaux de diabète (Folli F. et al, 1993 ; Morino K. et al, 2008). Ainsi, l'association du défaut d'activation des IRS et de la PI3K est une anomalie caractéristique du diabète de type 2 et elle est fortement corrélée avec la présence d'une insulino-résistance musculaire.

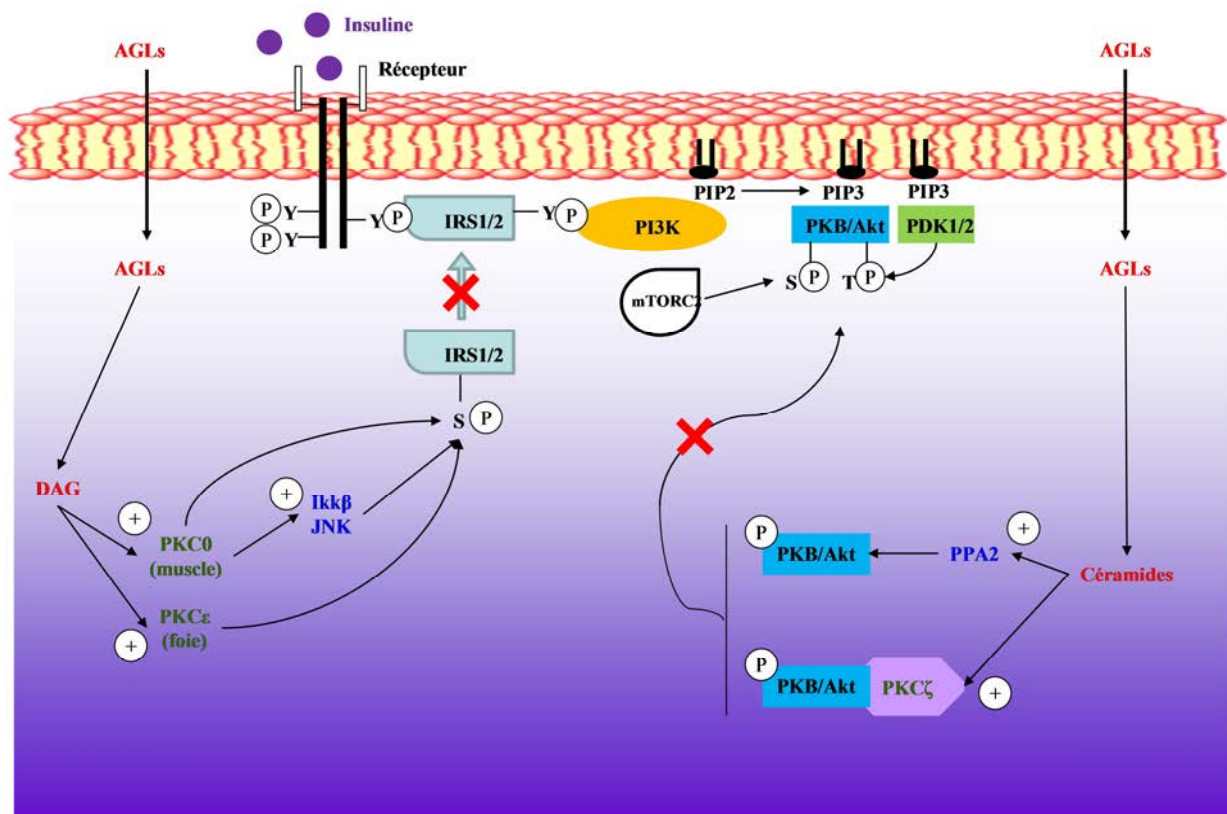
#### ✓ Implication de la voie des MAPK

Dans le muscle et le tissu adipeux isolés de sujets atteints d'un diabète de type 2, il a été démontré un rôle de l'activation de la voie des MAPK dans l'insulino-résistance. Au niveau du muscle squelettique, l'insuline augmente l'activité de la MAPK chez des sujets non-diabétiques mais pas chez des sujets diabétiques. En revanche, à l'état basal, cette activité est nettement augmentée chez les sujets diabétiques (Koistinen H.A. et al, 2003). Pour le tissu adipeux, les auteurs ont testé trois kinases de cette voie (ERK, p38 et JNK) en augmentant leur niveau d'expression sur des adipocytes isolés. Outre la réduction de l'expression membranaire de GLUT4, ils ont démontré qu'ERK réduit l'activation du récepteur à l'insuline ainsi que de ses IRS. Les kinases p38 et JNK agissent uniquement sur les IRS (Fujishiro M. et al, 2001, 2003).

### **c. Rôle des acides gras dans l'insulino-résistance**

En condition physiologique, le taux plasmatique en acides gras libres (AGL) est normalement augmenté durant le jeûne et diminué après le repas. L'insuline stimule la captation des AGL dans le foie et le tissu adipeux en favorisant leur métabolisation sous forme de triglycérides. Cependant, lorsque le tissu adipeux devient résistant à l'insuline, il n'est alors plus capable non seulement de stocker les lipides mais également de réduire la lipolyse. Lorsque la concentration en AGL est maintenue à des valeurs élevées, cela conduit à l'apparition d'une insulino-résistance et d'un diabète de type 2 (Paolisso G. et al, 1995).

L'augmentation en AGL résulte d'une accumulation des triglycérides dans les muscles et le foie ainsi que des produits issus de leur réestérification tels que le diacylglycérol (DAG) et les céramides (Boden G. et al, 2001). Des études ont mis en évidence une augmentation du contenu en DAG dans les muscles squelettiques de sujets insulino-résistant ou obèses avec un diabète de type 2 (Itani S.I. et al, 2002 ; Haus J.M. et al, 2009) et dans les muscles et le foie de différents modèles animaux d'obésité, d'insulino-résistance et de diabète de type 2 (Turinsky J., et al, 1990 ; Yu C. et al, 2002 ; Chibalin A.V. et al, 2008). L'augmentation du DAG conduit à l'activation de certains isoformes de la PKC mais seules les formes PKC $\theta$  et PKC $\epsilon$  semblent être inductrices de la résistance à l'insuline soit en agissant directement sur les IRS ou indirectement par l'activation des kinases IKK $\beta$  et JNK (Ikeda Y. et al, 2001 ; Mack E. et al, 2008 ; Samuel V.T. et al, 2010). L'accumulation de céramides a été retrouvée chez les animaux insulino-résistants et les sujets avec un diabète de type 2 (Powell D.J. et al, 2004 ; Haus J.M. et al, 2009). La cible principale des céramides est la PKB/Akt. L'accumulation de céramides dans les organes cibles de l'insuline conduit à une activation de la protéine phosphatase A2 (PPA2 : sérine/thréonine phosphatase) et de la PKC $\zeta$ . Ces deux enzymes agissent directement sur la PKB/Akt entraînant son inactivation (Hajduch E. et al, 2008 ; Hage Hassan R. et al, 2014). Outre ces actions du DAG et des céramides, il a été démontré une baisse d'activité de la diacylglycérol kinase  $\delta$ , dans le diabète de type 2 chez l'homme et le rongeur, conduisant à une accumulation de DAG (Chibalin A.V. et al, 2008).



**Schéma 19 : Acides gras libres et insulino-résistance**

L'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans les tissus insulino-sensibles induit l'activation d'isoformes de la PKC et de la PPA2. Ces enzymes activées sont responsables de l'interruption de la signalisation insulinémique faisant suite soit à l'inactivation des IRS soit à celle de PKB/Akt. PPA2 : Protéine Phosphatase A2 (adapté d'après Turban S. et Hajduch E., 2011).

#### **d. Stress du réticulum endoplasmique et résistance à l'insuline**

Les protéines nouvellement synthétisées sont repliées pour atteindre leurs structures tridimensionnelles et subir d'éventuelles modifications post-traductionnelles à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE).

L'accumulation de protéines mal-repliées dans le RE conduit à un stress du RE activant un processus adaptatif appelé : réponse aux protéines mal-repliées (UPR : Unfolded Protein Response) (Ron D. et Walter P., 2007). Cette réponse UPR fait intervenir trois protéines du RE avec PERK (protein kinase R-like ER kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et ATF6 (activating transcription factor 6). En condition non-stressante, ces trois protéines sont rattachées à une protéine chaperonne Bip qui les maintient sous un état inactif (Bertolotti A. et al, 2000). Lors du stress du RE, les protéines mal-repliées séquestrent Bip conduisant à la libération et l'activation de PERK et de IRE1. L'activation de PERK inhibe la traduction

protéique conduisant à l'activation de cibles traductionnelles telle qu'ATF4 (activating transcription factor 4). ATF4 active à son tour la transcription de CHOP (C/EBP homologous protein) (Harding H.P. et al, 2001). L'activation d'IRE1, quant à elle, induit la traduction de XBP1 (X-box binding protein-1) qui est transloqué dans le noyau afin de réguler l'expression de protéines et molécules chaperonnes du RE, impliquées dans la dégradation des protéines mal-repliées (Lee A.H. et al, 2003). Outre son activité endoribonucléase, IRE1 peut également s'associer avec d'autres facteurs dans le but d'activer la voie JNK. ATF6 transite dans l'appareil de golgi afin d'être clivé et activé pour stimuler l'expression des protéines et chaperonnes impliquées dans la dégradation des protéines mal-repliées. De récentes études ont émis l'hypothèse que le stress du RE pourrait être le mécanisme principal de la mise en place d'une insulino-résistance dans l'obésité et le diabète de type 2 (Ozcan U. et al, 2004 ; Tsiotra P.C. et Tsigos C., 2006). Chez la souris obèse, il a été démontré que le taux de marqueurs du stress du RE était augmenté aussi bien dans le foie que le tissu adipeux (Ozcan U. et al, 2004) inhibant la voie de signalisation insulinémique et par conséquent instaurant une résistance à l'insuline. Le stress du RE peut également activer NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), par l'intermédiaire de IKK $\beta$ , dans le foie ce qui augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) entraînant une insulino-résistance (Cai D. et al, 2005 ; Shoelson S.E. et al, 2006). Suite à l'activation de JNK et d'IKK $\beta$ , le stress du réticulum endoplasmique induit une altération de la signalisation insulinémique et la mise en place de la résistance à l'insuline.

En résumé, la régulation de l'homéostasie glucidique est un phénomène complexe associant de nombreux médiateurs et processus. Nous avons vu dans la partie 1 de cette introduction bibliographique que la vasopressine est une hormone multifonctionnelle et nous avons évoqué la localisation de ses récepteurs dans les organes impliqués dans le métabolisme du glucose. La partie 3 de cette introduction fera état des connaissances actuelles sur le lien probable existant entre la vasopressine et les troubles du métabolisme glucidique.

## **PARTIE 3: Vasopressine, trouble du métabolisme glucidique et diabète**

Les toutes premières études montrant un rôle de la vasopressine dans le développement du diabète, concernaient le diabète dit insipide. Toutefois, ce type de diabète n'est pas lié à une action de la vasopressine sur le métabolisme glucidique. Le diabète insipide a été décrit pour la première fois à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle et il se caractérise soit par une déficience sécrétoire en vasopressine (diabète insipide central) soit par une perte de réponse à l'AVP au niveau du rein (diabète insipide néphrogénique). Comme pour le diabète dit sucré (ou mellitus), les patients présentent une polydipsie et une polyurie.

De nombreuses études expérimentales et cliniques laissent penser que la vasopressine puisse avoir un rôle dans le développement du diabète sucré en altérant le métabolisme glucidique. La plupart de ces études ont concerné uniquement des effets aigus de la vasopressine ou bien montrent des associations avec le diabète de type 2 lui-même ou certains de ces paramètres physiologiques. Dans cette partie introductive, nous ferons le point sur l'état des connaissances actuelles témoignant de l'impact possible de la vasopressine dans le développement du diabète de type 2.

### **I. Vasopressine et métabolisme glucidique**

#### Vasopressine et foie :

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, il a été démontré que l'injection d'extraits hypophysaires induisaient une hyperglycémie et empêchaient l'hypoglycémie induite par l'insuline (Burn J.H., 1923 ; Clark G.A., 1928). A cette époque, les auteurs suggéraient déjà que cela pouvait être lié à une augmentation de la production de glucose par dégradation du glycogène (Clark G.A., 1928 ; Imrie C.G., 1929). Trente ans plus tard, avec l'arrivée des techniques de purification des hormones, la vasopressine sera reconnue comme une neurohormone capable d'induire une augmentation de la glycémie chez les mammifères (Bergen S.S. Jr et al, 1960 ; Schillinger E. et al, 1972). Dès lors, des travaux ont été entrepris pour comprendre comment la vasopressine pouvait conduire à une hyperglycémie transitoire mais majoritairement sur des cultures cellulaires ou sur des organes perfusés et/ou isolés.

En 1973, Hems D.A et ses collaborateurs ont démontré que la vasopressine induit une augmentation de la glycogénolyse hépatique chez le rat nourri alors qu'elle stimule la

néoglucogénèse à partir du lactate, du pyruvate et du glycérol et empêche la synthèse de glycogène, chez le rat à jeun. Ils ont aussi démontré que les effets de la vasopressine sont identiques à ceux du glucagon et s'effectue pour des concentrations plasmatiques du même ordre de grandeur (environ 100 pg.ml<sup>-1</sup>). Comme pour le glucagon, le foie est plus sensible à la vasopressine chez le rat à jeun que chez le rat nourri. Ces auteurs, ainsi que d'autres, ont également montré que la stimulation de la glycogénolyse hépatique passe par une augmentation de l'activation de la glycogène phosphorylase et une inhibition de l'activité de la glycogène synthase (Keppens S. et de Wulf H., 1975 ; Hems D.A. et al, 1975, 1976). En l'absence de connaissances sur les récepteurs impliqués, il a été suggéré que les effets hyperglycémisants de la vasopressine pourraient, comme le glucagon, passer par une augmentation de la production en AMPc. Cette hypothèse a été infirmée par la non augmentation de production d'AMPc sous l'influence de la vasopressine *in vivo* ou *ex vivo* (Kirk C.J. et Hems D.A., 1974 ; Keppens S. et de Wulf H., 1975). Au cours de la même période, il a été démontré d'une part, que l'activation de la phosphorylase kinase, de la glycogène phosphorylase et la libération de glucose hépatique, par la vasopressine, sont calcium-dépendante (Khoo J.C. et Steinberg D., 1975 ; Stubbs M. et al, 1976 ; Keppens S. et al, 1977 ; Van de Werve G. et al, 1977), et d'autre part, que la vasopressine stimule, indépendamment du calcium, l'incorporation de phosphatidylinositol (Kirk C.J. et al, 1977, 1978). In fine, les auteurs suggèrent que la vasopressine stimule la glycogénolyse par l'intermédiaire d'une augmentation du calcium cytosolique secondairement à l'augmentation de phosphatidylinositol. Le calcium semble également impliqué dans la voie de la néoglucogénèse (Whitton P.D. et al, 1978). L'implication des récepteurs V1a dans ces effets sera démontrée grâce à l'utilisation d'antagonistes spécifiques. L'antagoniste [d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Tyr(Me)<sup>2</sup>]AVP) inhibe l'augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase induite par la vasopressine sur des hépatocytes de rats et des hépatocytes humains (Cantau B. et al, 1980 ; Howl J. et al, 1991).

Comme nous l'avons précédemment décrit, la vasopressine induit, via son récepteur V1a, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Il est intéressant de noter que dans le foie, il existe un gradient de réponse calcique à la vasopressine, lié à un gradient décroissant de récepteurs V1a des hépatocytes périverneux vers les hépatocytes périportaux (Ostrowski N.L. et al, 1993 ; Nathanson M.H. et al, 1995 ; Tordjmann T. et al, 1998a, 1998b ; Serrière V. et al, 2001 ; Clair C. et al, 2003). Toutefois, à forte concentration de vasopressine, le gradient de densité des récepteurs est supprimé, suite à leur désensibilisation,

principalement au niveau de la zone périveineuse (Serrière V. et al, 2001). Bien qu'il soit établi qu'il existe aussi une hétérogénéité entre zone périportale et périveineuse en ce qui concerne le métabolisme des carbohydrates (Jungermann K., 1992), l'effet différentiel de la vasopressine sur le métabolisme du glucose dans les différentes zones du foie n'a pas été élucidé jusqu'à présent. Outre les effets hépatiques de la vasopressine sur la production endogène de glucose, il a également été démontré que la vasopressine stimule la voie de la néoglucogénèse au niveau du cortex rénal de rats (Stumpf B. et al, 1972) et dégrade le glycogène dans le rein de lapin (Darnton S.J., 1967).

#### Vasopressine et pancréas endocrine :

Les toutes premières investigations montrant le rôle de la vasopressine sur la fonction endocrine du pancréas datent des années 1980. En cette période, Dunning B.E. et ses collaborateurs ont montré que la vasopressine était capable de stimuler la sécrétion de glucagon *in vitro* mais n'agissait pas sur la sécrétion d'insuline dans des îlots pancréatiques en présence de glucose à 5,6 mM (Dunning B.E. et al, 1984a). Les auteurs ont réitéré cette expérience *in situ* sur des pancréas de rats perfusés. Ils ont ainsi mis en évidence que la vasopressine stimulait toujours la sécrétion de glucagon mais également la sécrétion en d'insuline (Dunning B.E. et al, 1984b). Ils ont montré également que la dDAVP (agoniste spécifique des récepteurs V2) induisait les mêmes réponses que la vasopressine pour une dose 100 fois plus forte. L'ensemble de ces travaux ont été repris par d'autres auteurs en considérant soit les cellules  $\beta$  pancréatiques, soit les cellules  $\alpha$  pancréatiques, soit en travaillant sur le pancréas perfusé. Il a été confirmé que la stimulation par la vasopressine conduisait à une augmentation de la sécrétion d'insuline *in vitro* et *in situ* (Chen T.H. et al, 1994 ; Lee B. et al, 1995) ainsi que celle du glucagon (Yibchok-Anun S. et Hsu W.H., 1998 ; Yibchol-Anun S. et al, 1999, 2000) et il a été démontré que les actions pancréatiques de la vasopressine passaient par une voie dépendante et par une voie indépendante du calcium. La voie dépendante du calcium ferait suite, comme vu sur la signalisation des récepteurs V1 (Partie 1), à la stimulation de la PLC. Cette réponse est diphasique avec un pic de concentration en calcium intracellulaire suivi par une phase de plateau soutenue. La première phase (génération du pic) serait principalement liée à la libération du calcium contenu dans le RE, lequel en retour augmente le flux entrant en calcium depuis la membrane plasmique. Dans la mesure où la sécrétion insulinémique fait intervenir des canaux calciques voltage-dépendant (**Schéma 15 : Induction de l'insulino-sécrétion dans les cellules  $\beta$  pancréatiques**), les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'entrée de calcium stimulée par la



vasopressine pourrait être liée à l'activation de ces canaux. Il a alors été montré que la vasopressine favorise l'ouverture des canaux voltage-dépendants de type L dans les cellules  $\beta$  mais pas dans les cellules  $\alpha$  faisant intervenir d'autres types de canaux voltage-dépendants (Chen T.H. et al, 1994 ; Yibchok-Anun S. et al, 2000). La réponse diphasique en calcium est bien corrélée avec une sécrétion diphasique en glucagon. Dans la voie calcium indépendante, Yibchok-Anun S. et ses collaborateurs ont montré, par l'utilisation d'un inhibiteur de la PLD, que la vasopressine pourrait stimuler la sécrétion de glucagon par cette voie. Pena A. et ses collaborateurs (2007a) ont montré que la vasopressine n'a pas d'effet majeur sur la sécrétion d'insuline mais que cette sécrétion est augmentée par 3 avec l'ajout d'un antagoniste sélectif des récepteurs V1a. En revanche, l'agoniste spécifique des récepteurs V1b induit la sécrétion d'insuline qui est totalement abolie par l'antagoniste de ces récepteurs. Les auteurs expliquent que la perte d'action de la vasopressine est probablement liée à des effets opposés entre les récepteurs V1b des cellules  $\alpha$  et les récepteurs V1a des cellules musculaires lisses des vaisseaux pancréatiques. Ainsi, l'emploi de l'antagoniste V1a permet de révéler l'insulino-sécrétion induite par les récepteurs V1b. Toutefois et contrairement au glucagon, la sécrétion d'insuline est monophasique avec la génération d'un seul pic de sécrétion en présence de l'agoniste V1b suggérant la génération d'un seul pic de calcium. Les récepteurs V1b agiraient différemment des récepteurs V1a dont la stimulation entraîne une réponse calcique biphasique (Briley E.M. et al, 1994). La génération de la phase soutenue reste encore peu claire.

Ces travaux, dans l'ensemble, ont démontré que la vasopressine stimule la sécrétion de glucagon et d'insuline par une voie calcium-dépendante et une voie calcium-indépendante. Sur la base de l'utilisation des antagonistes et en accord avec la présence des récepteurs V1b au niveau des îlots pancréatiques, il a été mis en évidence que les effets de la vasopressine sur la sécrétion de glucagon et/ou d'insuline passe effectivement par les récepteurs V1b (Saito M. et al, 1995 ; Yibchok-Anun S. et al, 1999 ; Folny V. et al, 2003 ; Oshikawa S. et al, 2004).

Cet effet paradoxal de la vasopressine sur deux hormones, le glucagon et l'insuline, ayant des effets opposés, a été partiellement éclairé par les données obtenues en présence de taux variables de glucose. Ainsi, il a été montré sur pancréas isolés et perfusés que la sécrétion d'insuline et de glucagon, induite par la vasopressine, est glucose dépendante *i.e.* la vasopressine stimule la sécrétion de glucagon en présence de concentrations faibles de glucose (<5 mM), et stimule la sécrétion d'insuline en présence de concentrations élevées de glucose (>5 mM) (Gao Z.Y. et al, 1990, 1992 ; Abu-Basha E.A. et al, 2002). En accord avec

ces observations, l'administration aiguë, par voie intraveineuse, de vasopressine conduit à une augmentation de la glycémie et de la glucagonémie chez l'homme sain (Spruce B.A. et al, 1985). Cependant, sur un modèle de pancréas de rat perfusé *in situ*, la sécrétion de glucagon induite par une perfusion de vasopressine est plus importante chez le rat diabétique de type 1, que chez le rat sain (Yibchok-Anun S. et al, 2004).

## **II. Vasopressine et trouble du métabolisme en lien avec le diabète**

C'est au début des années 1980 qu'un lien entre taux plasmatique de vasopressine et diabète sucré a été suspecté. En effet, Zerbe R.L. et ses collaborateurs ont observé, sur un petit nombre de sujets, que le taux de vasopressine plasmatique était 6 à 16 fois plus élevé chez des sujets avec un diabète de type 1 ou de type 2, que chez des sujets témoins. Des études ultérieures ont confirmé cette observation chez l'homme (Zerbe R.L. et al, 1979 ; Walsh C.H. et al, 1979 ; Kamoi K. et al, 1991 ; Tallroth G. et al, 1992) et dans des modèles animaux (Van Itallie C.M. et al, 1982 ; Phillips P.A. et al, 1995).

### **a. Etudes cliniques : mise en évidence d'une association**

Comme indiqué dans la Partie 1, la mise au point du dosage de la copeptine comme marqueur de la sécrétion de la vasopressine a permis le lancement de plusieurs études chez l'homme pour rechercher une association entre vasopressine et différentes pathologies.

La toute première étude clinique, concernant la copeptine et les troubles du métabolisme glucidique, a été effectuée en 2009, par Saleem U. et ses collaborateurs, sur 2490 sujets de groupes ethniques différents (50% américano-africain et 50% non-hispanique) issus de fratrie dont au moins un des frères et sœurs était hypertendu. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la copeptinémie était associée avec l'IMC, la circonférence de taille, l'insulinémie et la glycémie à jeun, l'HOMA-IR, la présence d'un diabète et les triglycérides, après ajustement avec l'âge, le sexe et covariables usuelles. D'un point de vue général, les auteurs ont montré que la copeptinémie est associée avec le syndrome métabolique et qu'elle augmente avec le nombre de facteurs impliqués dans ce syndrome aussi bien chez les sujets diabétiques que non-diabétiques. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude transversale sur 4742 sujets issus de la cohorte MDC (Malmö Diet and Cancer study) (Enhörning S. et al, 2011).

Des études longitudinales, sur de grandes cohortes avec un suivi de plusieurs années, ont montré qu'une copeptinémie élevée au début de l'étude constituait un facteur prédictif de développement ultérieur d'obésité, de syndrome métabolique et de diabète (Enhörning S. et al, 2010, 2013 ; Abbasi A. et al, 2012).

Dans notre équipe, l'analyse des données de la cohorte DESIR issue de la population générale, constituée de 3615 sujets suivis pendant 9 ans, a permis de montrer une corrélation inverse entre la prise hydrique quotidienne et le risque d'apparition d'une hyperglycémie. Les sujets ayant déclaré avoir une prise d'eau inférieure à 0,5 l /jour (et qui donc devaient avoir une vasopressinémie élevée) avait un risque multiplié par 2,5 (Roussel R. et al, 2011). Après ajustement avec les facteurs confondant, les Odds ratio (OR, indice de confiance 95%) pour l'hyperglycémie suivant les catégories de prise hydrique (<0,5 L/j, n = 677 ; 0,5 – 1,0 L/j, n = 1754 et > 1,0 l/j, n = 1184) étaient 1,00 ; 0,68 (0,52 – 0,89) et 0,79 (0,59 – 1,05), respectivement (p = 0,016).

A notre connaissance, un seul travail a étudié chez l'homme, les conséquences des polymorphismes de la vasopressine ou de ses récepteurs sur le métabolisme. Suite aux résultats obtenus chez la souris KO-V1a (voir ci-dessous), Enhörning S et collaborateurs ont étudié l'effet de 4 polymorphismes du récepteur V1a chez 6055 sujets de la cohorte MDC. Leur principal résultat est qu'un des polymorphismes (allèle T du rs1042615) est associé à une glycémie à jeun légèrement plus élevée et à une triglycéridémie plus faible. Chez les sujets qui ont l'IMC et l'apport lipidique alimentaire les plus élevés, l'allèle T est associé à une prévalence plus élevée de diabète, en particulier chez les hommes (Enhörning S. et al, 2009). Cet effet du genre dans les études d'association concernant la vasopressine/copeptine reste à confirmer. En effet, dans l'étude PREVEND (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease), les auteurs ont trouvé une association plus forte entre la copeptinémie et le risque de survenue d'un diabète de type 2 chez la femme (Abbasi A. et al, 2012) alors qu'une autre étude très récente (Then C. et al, 2014) a montré une association entre la copeptinémie et le diabète de type 2 uniquement chez l'homme.

## **b. Etudes expérimentales : vasopressine et trouble du métabolisme glucidique**

Comme indiqué ci-dessus, le taux plasmatique de vasopressine est élevé dans le diabète chez l'homme et l'animal. Actuellement et à notre connaissance, les antagonistes V1a et V1b de la vasopressine ont été utilisés uniquement sur des cultures cellulaires et sur organes perfusés afin de montrer leur effets bloquant sur l'action aigüe de la vasopressine dans le métabolisme glucidique. En 2004, Tanoue A. et ses collaborateurs ont généré des souris KO pour le récepteur V1a ou pour le récepteur V1b ainsi que le double KO V1a/V1b afin d'en étudier les conséquences sur les métabolismes glucidique et lipidique.

L'ensemble des résultats obtenu par Tanoue A. et collaborateurs sur des souris avec l'inactivation d'un seul type de récepteur suggère que la vasopressine favoriserait la résistance à l'insuline par l'intermédiaire de ses récepteurs V1b (Fujiwara Y. et al, 2007) alors qu'elle améliorerait sa sensibilité par ses récepteurs V1a (Aoyagi T. et al, 2007). Les récepteurs V1a et V1b médieraient aussi des effets inverses sur la lipolyse et la lipogénèse (Hiroyama M. et al, 2007, 2009 ; Tanoue A., 2009).

A ce jour, il s'agit des seules études réalisées *in vivo* montrant l'impact de la vasopressine et de ses récepteurs sur la régulation de l'homéostasie glucidique. Cependant, ces données semblent montrés des effets inverses à tous ceux obtenus *in vitro*, *ex vivo*, *in situ* et même des effets aigüs *in vivo* de la vasopressine.

Les auteurs ont alors généré des souris double KO V1a/V1b afin de pouvoir clarifier l'impact global des récepteurs sur l'homéostasie glucidique (Nakamura K. et al, 2009). Sous régime normal et riche en lipides, les souris double KO V1a/V1b ont une réponse glycémique significativement supérieure à celle des souris contrôles au cours d'un test de tolérance au glucose mais les aires sous la courbe sont significativement différentes uniquement avec le régime riche en lipides. Au cours d'un test de tolérance à l'insuline, les souris KO V1a/V1b sous régime hyperlipidique présentent une réponse glycémique plus élevée que les souris contrôles. Ces résultats montrent que les souris double KO ont une résistance à l'insuline sous régime gras ce qui est en accord avec la réduction de la forme phosphorylée d'Akt dans des adipocytes différenciés (le tissu adipeux étant le seul organe insulino-sensible contenant les deux types de récepteurs). En conclusion, les auteurs montrent que le phénotype de ces souris est similaire à celui obtenu avec les souris KO V1a seul et donc que les effets V1a sur le métabolisme glucidique, par la vasopressine, sont prépondérants par rapport aux effets V1b.

Ces mêmes auteurs ont étudié le phénotype de rats Brattleboro présentant un diabète insipide d'origine centrale dû à une mutation récessive empêchant la sécrétion de vasopressine. Ces rats présentent une meilleure tolérance au glucose lorsqu'ils sont comparés à des rats hétérozygotes Long-Evans pour cette mutation. Les auteurs émettent plusieurs hypothèses impliquant l'ocytocine et l'absence de stimulation de récepteurs V2 chez les rats Brattleboro pour expliquer ces résultats paradoxaux (phénotype inverse chez les souris KO V1a /V1b et rats Brattleboro) :

- ✓ L'ocytocine dont l'expression est augmentée chez les rats Brattleboro, pourrait améliorer la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (Boer G.J. et al, 1988 ; Takayanagi Y. et al, 2008).
- ✓ Les récepteurs V2, en activant l'adénylate cyclase, induisent la phosphorylation de CREB (cAMP responsive element binding protein) laquelle favorise l'insulino-résistance en déclenchant le facteur de transcription ATF3 qui dérégule l'expression de GLUT4 (Yasui M. et al, 1997 ; Qi L. et al, 2009). Chez les rats Brattleboro, l'absence de signalisation sur les récepteurs V2 conduirait alors à une amélioration de la sensibilité à l'insuline au moins dans le tissu adipeux. Le point faible de cette hypothèse est que la présence des récepteurs V2 dans le tissu adipeux n'est basée que sur l'expression d'ARNm rapportée dans un seul article issu de ce même groupe (Fujiwara Y. et al, 2007).

Sur la base des éléments décrits ci-dessus, nous avons mené au cours de cette thèse des travaux *in vivo* chez le rat visant à démontrer que la vasopressine peut conduire à des altérations du trouble du métabolisme glucidique et avoir, à long terme, un impact dans le développement du diabète de type 2.

# Etudes Expérimentales

---

## Objectifs

L'ensemble des travaux réalisés chez l'homme ont permis de montrer une association entre des taux variables de copeptine (indirectement vasopressine) et le syndrome métabolique, la survenue d'un diabète de type 2 et l'obésité. Chez le rongeur, les études réalisées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont démontré que la vasopressine favorise la production hépatique et extra-hépatique de glucose en stimulant la glycogénolyse et/ou la néoglucogénèse. Cette neurohormone a également été montrée jouer un rôle dans la sécrétion endocrinienne des hormones pancréatiques. Toutefois, ces études expérimentales ne concernaient que des effets aigus de la vasopressine. De plus, à l'exception des souris KO V1a et/ou V1b, ayant montré des effets inverses à ceux obtenus chez le rat, peu d'études ont porté sur le rôle des récepteurs V1a et V1b sur le métabolisme glucidique *in vivo*. Le but de ce projet de thèse a donc été d'étudier les effets chroniques de la vasopressine et de ses récepteurs sur le métabolisme glucidique dans différents modèles animaux et de déterminer s'il existe un lien de causalité entre des taux variables de vasopressine et les troubles du métabolisme glucidique en relation avec le développement d'un diabète de type 2.

La première étude de ce projet a donc concerné le rôle, *in vivo*, des récepteurs V1a et V1b dans les effets de la vasopressine sur la glycémie par l'utilisation des antagonistes SR 49059 et SR 149415, respectivement. Comme nous le verrons, cette étude a mis en évidence que le prétraitement des rats avec l'antagoniste V1a inhibe l'augmentation de la glycémie alors que l'antagoniste V1b inhibe la sécrétion de glucagon, induites par la vasopressine.

Dans la seconde étude, nous avons étudié les effets chroniques de la vasopressine et l'implication des récepteurs V1a chez le rat sain Sprague-Dawley. Cette étude a été complétée par des travaux utilisant un modèle de syndrome métabolique *i.e.* le rat Zucker obèse et le rat contrôle correspondant : le rat Zucker Lean. Dans ces études nous montrons que la vasopressine augmente la glycémie et l'insulinémie à jeun chez les rats Lean et favorise l'intolérance au glucose chez les rats obèses.

Enfin dans le but de mieux comprendre la mécanistique par laquelle la vasopressine conduit à ses différents effets, nous avons réalisé des études moléculaires sur l'expression de gènes d'enzymes des voies de la glycogénèse, de la néoglucogénèse, de la lipogénèse et du stress du réticulum endoplasmique.

# Rôle des récepteurs V1a et V1b dans les effets hyperglycémiantes aigus de la vasopressine

### **I. Introduction**

Depuis les années 1970, il est connu qu'une administration aiguë d'AVP augmente transitoirement la glycémie chez l'homme et le rongeur (Hems D.A. et al, 1975 ; Rofe A.M. et Williamson D.H., 1983 ; Spruce B.A. et al, 1985). Cette action de la vasopressine pourrait être liée à une augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique par l'intermédiaire de ses récepteurs V1a (Hems D.A. et al, 1973 ; Wideman C.H. et Murphy H.M., 1993, Howl J. et al, 1991). Les récepteurs V1b, quant à eux, sembleraient impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique en jouant, de manière glucose-dépendante, sur la sécrétion d'insuline ou de glucagon par le pancréas. Toutefois, l'ensemble de ses travaux sur les récepteurs V1a et V1b ont été réalisés soit sur des cultures cellulaires soit sur des organes isolés perfusés avec de l'AVP. Le but de ce travail a été d'étudier l'implication *in vivo* des récepteurs V1a et V1b de la vasopressine dans les effets aigus de la vasopressine sur la glycémie chez le rat sain. Pour cela, j'ai étudié l'effet aigu de doses croissantes de vasopressine sur la réponse glycémique de rats contrôles ou prétraités pendant 4 jours avec un antagoniste V1a ou un antagoniste V1b. Afin de vérifier le blocage effectif des récepteurs par les antagonistes, nous en avons testé les conséquences sur des effets connus de la vasopressine, à savoir une augmentation de la pression artérielle par les récepteurs V1a vasculaires et de la sécrétion d'ACTH et de corticostérone par les récepteurs V1b centraux.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Drogues**

La Vasopressine ([arginine<sup>8</sup>]-vasopressin acétate salt, AVP) (Sigma Aldrich, St Quentin, France) a été dissoute dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) pour obtenir une solution mère de 800 ng.µl<sup>-1</sup>. Les antagonistes des récepteurs V1a (SR 49059) and V1b (SR 149415) ont été fournis par Sanofi-Aventis (Toulouse, France) et ont été directement utilisés, mélangés à la nourriture. Pour la préparation chirurgicale des rats, nous avons utilisé du pentobarbital sodique (Nembutal®, Céva Santé Animale) comme anesthésiant général, de la procaine hydrochloride à 20 mg.ml<sup>-1</sup> comme anesthésiant local (Merck, Darmstadt, Germany), du sérum physiologique hépariné (50 U.I.ml<sup>-1</sup>) (Heparin Choay®, Sanofi-Synthélabo, Le Plessis-Robinson, France).

### **2. Traitements**

Comme dans toutes les expériences décrites dans ce mémoire, les rats ne sont utilisés qu'une semaine après leur livraison afin de les acclimater aux conditions d'hébergement du Centre d'Exploration Fonctionnelle du CRC dans des conditions cycliques d'éclairage de 12h de lumière – 12h d'obscurité, libre accès à l'eau et à la nourriture (A04, SafeDiet, Augy, France). L'expérience a été menée sur des rats mâles adultes (264 ± 7 g) de souche Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France), placés en cages à métabolisme individuelles pendant 7 jours. Après 3 jours d'adaptation à ces cages, ils ont été traités les 4 jours suivants avec 0 (groupe contrôle), 10 ou 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup> d'antagoniste V1a ou V1b administré par voie orale (mélangé à la poudre alimentaire). Les rats ont légèrement été restreints en nourriture (18 g.24h<sup>-1</sup>) afin de s'assurer qu'ils ingèrent la quantité d'antagoniste souhaitée. Le dernier jour de traitement, les animaux sont anesthésiés et cathétérisés pour l'injection de doses croissantes d'AVP. Le choix de la souche de rat (Sprague-Dawley versus Wistar) a été déterminé lors d'une expérience préliminaire (**Annexe 1**).



### **3. Chirurgie des animaux**

A partir de ce point, l'expérience dure 2 heures et 30 minutes sous anesthésie pour chaque rat. Après pesée, les rats sont anesthésiés par voie intrapéritonéale avec du pentobarbital sodique (*i.p.* 60 mg.kg<sup>-1</sup>). Ils sont ensuite rasés, placés sur une couverture chauffante et leur température corporelle est surveillée grâce à une sonde anale (36 – 37°C). Une trachéotomie est effectuée en plaçant une canule (PE-100, Intramedic polyethylene tubing, Clay Adams, New Jersey, USA) dans la trachée pour faciliter leur respiration. Un cathéter est introduit dans l'artère fémorale jusqu'à la bifurcation aortique pour l'enregistrement en continu de la pression artérielle (Iworx<sup>®</sup> 214, Bioseb, France). Un autre cathéter est placé dans la veine jugulaire gauche (PE-50, Intramedic polyethylene tubing, Clay Adams, New Jersey, USA) pour l'administration des différentes doses de vasopressine par l'intermédiaire d'une pompe à seringue (syringe pump model 351, Sage instrument, California, USA). La vasopressine est injectée lentement sous un faible volume (150 µl/100 g de poids corporel à 100 µl.min<sup>-1</sup> pendant 90 secondes). Dix minutes avant la première injection de vasopressine et entre chaque injection de vasopressine, les animaux sont perfusés par voie veineuse avec du sérum physiologique, à 100 µl.min<sup>-1</sup> par 100g de poids corporel, jusqu'au retour aux valeurs basales de glycémie et de pression artérielle.

Remarque : Une mise au point a été nécessaire pour l'injection de vasopressine. J'ai pu observer qu'une injection trop rapide induisait une réponse physiologique intense caractérisée par des spasmes vasculaires.

### **4. Paramètres mesurés**

Des recueils d'urine sont effectués durant la période de prétraitement afin de vérifier que les antagonistes n'induisent pas de déséquilibre hydrique. Durant les deux derniers jours en cage à métabolisme, des recueils urinaires et des pesées sont effectués sur deux périodes successives de 24 heures afin de mesurer la prise alimentaire, la prise de boisson, le débit et l'osmolalité urinaires. L'effet de l'injection aiguë de doses croissantes de vasopressine, sur la glycémie et la pression artérielle des rats prétraités par l'antagoniste V1a, V1b ou chez les rats contrôle, a été déterminé à différents temps (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 et 30 minutes) après l'administration de chaque dose de vasopressine (0, 30, 100, 300 et 500 ng.kg<sup>-1</sup>). La glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre (One Touch<sup>®</sup> Vita TM, LifeScan, France) sur des échantillons sanguins de 2 µl prélevés à la queue. La pression artérielle a été évaluée et

analysée avec le logiciel Labscribe 2<sup>TM</sup>. Dans la mesure où la vasopressine agit sur l'axe corticotrope et sur le pancréas endocrine, via ses récepteurs V1b, des échantillons plasmatiques ont été collectés aux temps 0, 1, 3, 5 and 10 minutes pour estimer le statut hormonal en ACTH, corticostérone (Milliplex® MAP Kit, Millipore, France), insuline (Mercodia, Sweden) et glucagon (Clinisciences, France) par une méthode Elisa.

## **5. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques, entre les groupes de rats, ont été établies par une analyse de variance à un facteur avec des mesures répétées. Les ANOVA ont été suivies, quand cela était approprié, par un test de Fisher *post hoc*. Les différences statistiques, entre les différentes doses d'AVP pour un même groupe de rat, ont été évaluées par un test t apparié de Student. Le niveau de significativité choisi était de  $p < 0,05$ .

### **III. Résultats et discussion**

#### **1. Effets du prétraitement par les antagonistes des récepteurs V1a et V1b sur la fonction rénale**

Bien que le but principal de l'étude concerne la vasopressine, ses récepteurs et la glycémie, il nous a semblé intéressant d'analyser les effets des antagonistes V1a et V1b sur la fonction rénale et en particulier sur la concentration urinaire.

##### **Antagoniste des récepteurs V1a :**

Le traitement chronique avec un antagoniste V1a conduit à une réduction dose-dépendante du débit urinaire, une osmolarité urinaire qui tend à augmenter ainsi qu'une réduction de la prise hydrique (**Tableau 1**). L'évolution de ces paramètres est donc en faveur d'une augmentation de l'activité de concentration du rein comme le reflète la diminution de la réabsorption de l'eau libre. Ces résultats sont en accord avec les quelques données de la littérature suggérant que le récepteur V1a s'oppose aux effets V2 afin de limiter les effets antidiurétiques lorsque que la concentration en vasopressine est trop importante (Ledderhos C. et al, 1995 ; Bankir L. et al, 2001b ; Koshimizu T.A. et al, 2012). En effet, il est connu que la vasopressine augmente l'activité de concentration urinaire via son récepteur V2, en augmentant le recrutement des aquaporines 2 tout au long du canal collecteur et en favorisant la réabsorption de sodium par le canal sodium épithélial (ENaC) dans le canal collecteur cortical (Nicco C. et al, 2001) et la réabsorption d'urée par les transporteurs d'urée UT-A1 dans la partie terminale du canal collecteur médullaire (Sands J.M. et al, 2011). Il a également été démontré la présence des récepteurs V1a dans le canal collecteur, localisés principalement au niveau apical des cellules intercalaires (Tashima Y., 2001 ; Carmosino M., 2007 ; Yasuoka Y., 2013a) alors que les récepteurs V2 sont localisés au niveau des membranes basolatérales des cellules principales. Des études *ex vivo* (sur tubules isolés de lapin) suggèrent que l'effet modulateur des V1a serait médié par la production de PGE2 qui stimulerait des phosphodiésthérases et donc limiterait l'augmentation d'AMPC intracellulaire induite par la stimulation des récepteurs V2. (Breyer M.D. et Ando Y., 1994 ; Bankir L., 2001a). Chez l'homme sain, il a été montré que la vasopressine conduisait des effets antidiurétique dès l'administration d'une dose de 1 pg.kg<sup>-1</sup>. Nos travaux ne permettent pas de définir les mécanismes mis en jeu mais démontrent que, même en condition basale (en absence d'excès de vasopressine), les récepteurs V1a exercent un contrôle négatif sur l'activité des récepteurs V2.

### Antagoniste des récepteurs V1b :

En ce qui concerne les effets de l'antagoniste V1b sur les paramètres urinaires, nous n'avons observé aucun effet significatif sur l'activité de concentration urinaire excepté une valeur d'osmolalité légèrement supérieure chez les rats prétraités avec la dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup> par rapport aux rats témoins. Cet effet n'est pas retrouvé avec la dose supérieure (30 mg.kg<sup>-1</sup>) d'antagoniste (**Tableau 1**). Au début des années 1990s, il a été démontré la présence du récepteur V1b au niveau du rein (De Keyser Y. et al, 1994 ; Lolait S.J. et al, 1995b) aussi bien chez l'homme que chez le rongeur. Très récemment, Hus-Citharel A et ses collaborateurs (39<sup>ème</sup> Colloque SNE, 2013) ont montré que les récepteurs V1b étaient essentiellement exprimés dans la partie terminale des canaux collecteurs et qu'ils étaient localisés dans les mêmes cellules que celles exprimant l'aquaporine 2. Cependant le rôle de ce récepteur dans l'homéostasie hydrique ou dans les transports de solutés a été peu exploré et reste peu clair. L'inactivation du gène du récepteur V1b induit une augmentation de la prise de boisson et du débit urinaire chez la souris mais ces effets semblent plutôt médiés par des effets centraux impliquant la régulation de la soif et de la température corporelle (Daikoku R. et al, 2007). Dans nos expériences, la prise hydrique n'a pas été modifiée par l'administration d'antagoniste V1b. Nous ne pouvons exclure qu'à plus long terme (au-delà de 4 jours), un effet sur la soif apparaisse.

**Tableau 1: Paramètres physiologiques de la fonction rénale au cours du prétraitement avec un antagoniste du récepteur V1a ou du récepteur V1b**

	Antagoniste V1a			Antagoniste V1b		
	Contrôle (n = 5)	10 mg/kg.24h <sup>-1</sup> (n = 5)	30 mg/kg.24h <sup>-1</sup> (n = 5)	Contrôle (n = 8)	10 mg/kg.24h <sup>-1</sup> (n = 8)	30 mg/kg.24h <sup>-1</sup> (n = 8)
Poids corporel (g)	269 ± 19	254 ± 13	262 ± 16	244 ± 18	228 ± 16	236 ± 13
Prise alimentaire (g.24h <sup>-1</sup> )	17,8 ± 0,1	18,0 ± 0,0	15,9 ± 1,5	18,0 ± 0,1	17,9 ± 0,1	17,9 ± 0,1
Prise hydrique (ml.24h <sup>-1</sup> )	23,6 ± 0,6	20,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	17,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	24,8 ± 1,5	21,5 ± 0,8	24,6 ± 1,2
Débit urinaire (ml.24h <sup>-1</sup> )	9,7 ± 0,6	7,8 ± 1,2	5,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	10,9 ± 0,9	9,0 ± 0,6	11,5 ± 0,8
Osmolalité Urinaire (mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O)	1533 ± 233	1551 ± 163	1843 ± 264	1164 ± 67	1473 ± 62 <sup>a</sup>	1286 ± 84
Excrétion osmolaire (mosm.24h <sup>-1</sup> )	14,6 ± 1,9	11,5 ± 0,7	9,7 ± 1,4 <sup>b</sup>	12,6 ± 1,2	13,1 ± 0,7	14,1 ± 1,3
TcH <sub>2</sub> O (mosm.24h <sup>-1</sup> )	39,0 ± 6,5	30,3 ± 1,5	26,8 ± 4,8	31,0 ± 3,3	34,6 ± 1,8	37,7 ± 3,6

Anova suivie d'un test de Fisher *post hoc* ; a : 10 mg/kg.24h<sup>-1</sup> vs. contrôle, p<0,001 ; b : 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup> vs. contrôle, p<0,03

## **2. Efficacité des antagonistes des récepteurs V1a et V1b**

Afin de démontrer l'efficacité du blocage des récepteurs V1a et V1b, par les antagonistes SR 49059 et SR 149415, nous avons choisi de mesurer parallèlement aux variations de glycémie, les variations de la pression artérielle et de la sécrétion hormonale de l'axe HHS induites par l'injection aiguë de vasopressine en présence de l'un ou de l'autre des antagonistes.

### **Récepteur V1a et pression artérielle :**

Il est largement décrit dans la littérature que la vasopressine joue un rôle vasoconstricteur par l'intermédiaire de ses récepteurs V1a présents sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 2** et la **Figure 1**.

Comme attendu, la vasopressine induit une augmentation dose-dépendante et transitoire de la pression artérielle chez les rats contrôles. Le pic d'hypertension est observé dans les 3 minutes qui suivent l'injection de vasopressine. La durée de la réponse hypertensive est d'autant plus grande que la dose de vasopressine injectée est importante.

Le prétraitement par l'antagoniste V1a, quelle que soit la dose, n'a pas induit de modification de la pression artérielle basale, mesurée sur animal anesthésié. Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle la vasopressine ne joue pas de rôle majeur via ses récepteurs V1a vasculaires dans la régulation de la pression artérielle dans les conditions physiologiques normales comme souligné dans l'introduction générale. Le prétraitement par l'antagoniste V1a a induit une inhibition de l'effet hypertenseur aigu de la vasopressine. Les rats traités avec la plus forte dose d'antagoniste ( $30 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$ ) ont une amplitude de réponse hypertensive identique à celle des rats traités avec la dose de  $10 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$  mais une réponse plus faible que les rats contrôles.

### **Récepteur V1b et axe HHS :**

L'antagoniste V1b n'a pas bloqué l'effet hypertenseur aigu de la vasopressine mais de façon intrigante semble potentialiser cet effet, tout du moins avec la dose  $10 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$ . Nous n'avons pas d'hypothèse pour expliquer cet effet. Cependant le calcul d'aire sous la courbe dose-réponse ne fait pas apparaître de différence significative entre les groupes (**Tableau 2 et Figure 1**).

Au niveau du système nerveux central, il a été démontré que la vasopressine agit de manière synergique, avec la CRH, sur la sécrétion d'ACTH par l'intermédiaire de ses récepteurs V1b situés dans l'adénohypophyse (Orcel H. et al, 2002 ; Serradeil-Le Gal C. et al, 2002b ; Tanoue A. et al, 2004 ; Aguilera G. et al, 2008). L'induction de cette sécrétion conduit à une stimulation de la sécrétion de glucocorticoïdes par la glande surrénale. Dans ses travaux visant à caractériser l'antagoniste V1b, Serradeil-Le Gal C et ses collaborateurs (2002b) ont montré que l'administration *i.p* ou orale de l'antagoniste V1b (30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>) inhibe la sécrétion d'ACTH induite par une injection intraveineuse de vasopressine (300 ng.kg<sup>-1</sup>). Les résultats présentés ici montrent que le prétraitement avec l'antagoniste V1b n'a pas modifié le niveau basal en ACTH et corticostérone. Cependant, chez les rats contrôles, l'injection de vasopressine n'a pas entraîné, contrairement à ce qui était attendu, d'augmentation de la sécrétion hormonale en ACTH et corticostérone (**Figure 2**). Cette apparente absence d'effet de la vasopressine sur la sécrétion de ces deux hormones pourrait être liée aux conditions expérimentales : 1) pendant les 7 jours précédents la chirurgie, les rats étaient placés en cage à métabolisme individuelle alors qu'il s'agit d'animaux grégaires. Nous ne pouvons pas exclure que cette condition d'hébergement ait générée un stress chronique conduisant à une concentration plasmatique basale de vasopressine élevée. En accord avec les données de la littérature, l'antagoniste SR149415 (10 mg/rat, *p.o*) n'a pas d'effet sur les sécrétions hormonales de l'axe HHS au cours d'un stress chronique (Chen J. et al, 2008). Afin de pouvoir observer un effet du SR149415 sur l'axe HHS, il nous aurait incombé d'utiliser des doses d'antagoniste plus importante. Cependant, cet antagoniste des récepteurs V1b dispose également d'une affinité pour le récepteur à l'ocytocine. L'administration de doses trop forte conduit à une baisse de sélectivité des récepteurs V1b ; et 2) des travaux controversés ont mis en évidence que le pentobarbital sodique induisait soit une augmentation, soit une diminution de la sécrétion d'ACTH chez le rongeur (Vahl T.P. et al, 2005). Notons que les dosages d'ACTH et de corticostérone ne sont pas des dosages courants chez le rat et que le plus souvent il s'agit de dosages RIA or nous avons fait des dosages qui ne sont peut être pas aussi fiables. Cette partie expérimentale ne nous a donc pas permis de tester l'efficacité de l'antagoniste V1b sur l'axe HHS mais nous avons pu montrer un effet inhibiteur de l'antagoniste sur la sécrétion du glucagon (voir figure 5, page 101).

**Tableau 2 : Amplitude de la réponse pressive à une injection aiguë de vasopressive chez des rats Sprague-Dawley prétraités ou non avec un antagoniste des récepteurs V1a ou V1b.**

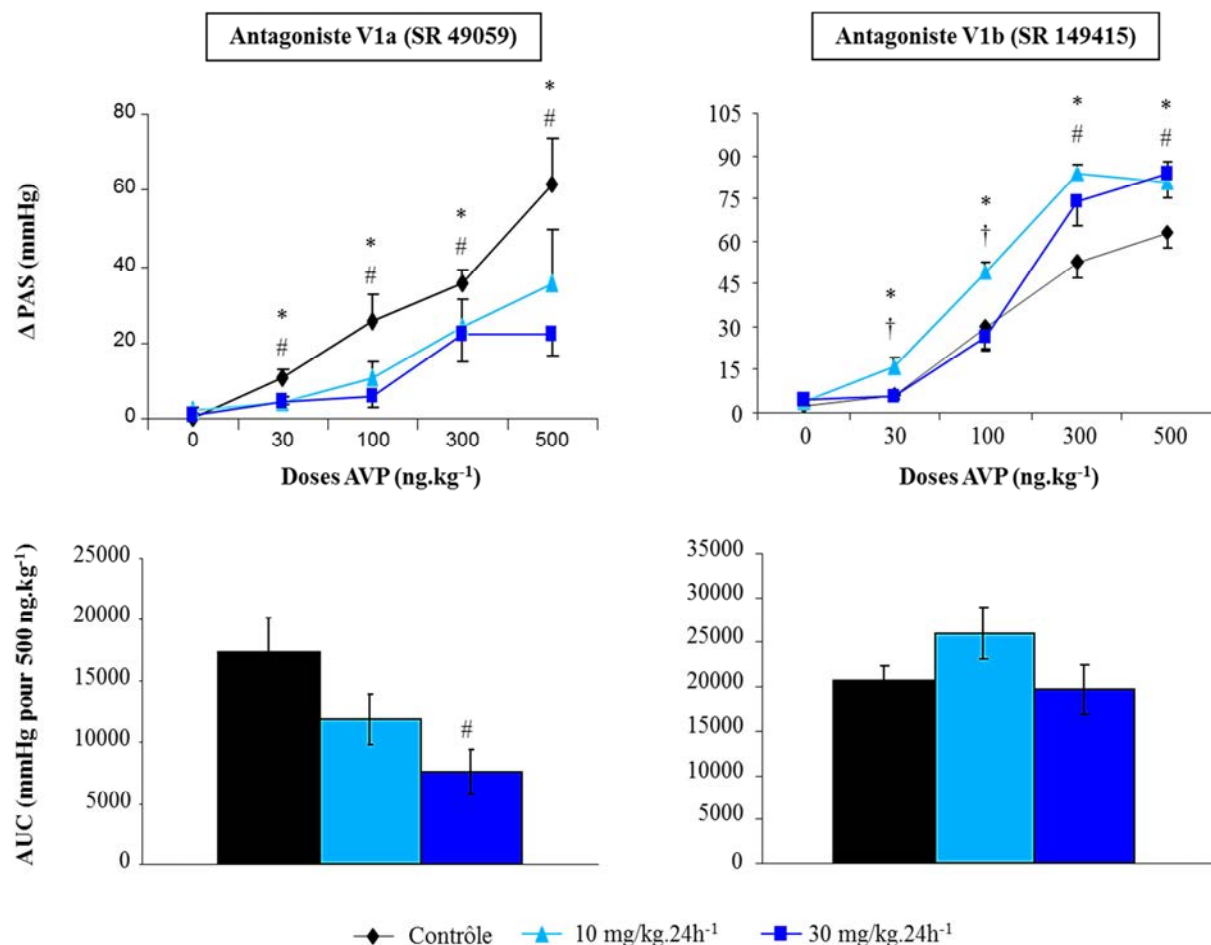
		Doses AVP (ng.kg <sup>-1</sup> )					
		0	30	100	300	500	
<b>Antagoniste V1a (SR 49059)</b>							
Contrôle (n = 5)	PAS repos	120 ± 6	115 ± 7	111 ± 6	105 ± 3	85 ± 7	
	PAS max	120 ± 6	126 ± 7 <sup>a</sup>	136 ± 9 <sup>a</sup>	137 ± 6 <sup>a</sup>	146 ± 6 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	0 ± 1	11 ± 2	26 ± 7	35 ± 4	62 ± 12	
10 mg.kg <sup>-1</sup> (n = 6)	PAS repos	114 ± 8	117 ± 9	113 ± 8	112 ± 8	106 ± 6	
	PAS max	116 ± 8	123 ± 8 <sup>a</sup>	127 ± 9 <sup>a</sup>	139 ± 9 <sup>a</sup>	146 ± 11 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	2 ± 1	4 ± 1 <sup>*</sup>	11 ± 3 <sup>*</sup>	24 ± 4 <sup>*</sup>	36 ± 14 <sup>*</sup>	
30 mg.kg <sup>-1</sup> (n = 5)	PAS repos	117 ± 7	118 ± 6	111 ± 7	96 ± 8	96 ± 7	
	PAS max	118 ± 7	122 ± 6 <sup>a</sup>	117 ± 7	118 ± 7 <sup>a</sup>	118 ± 7 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	1 ± 1	4 ± 1 <sup>#</sup>	6 ± 3 <sup>#</sup>	22 ± 7 <sup>#</sup>	22 ± 6 <sup>#</sup>	
<b>Antagoniste V1b (SR 149415)</b>							
Contrôle (n = 6)	PAS repos	136 ± 6	137 ± 6	115 ± 18	77 ± 3	77 ± 4	
	PAS max	139 ± 6	143 ± 6 <sup>a</sup>	137 ± 16 <sup>a</sup>	135 ± 4 <sup>a</sup>	143 ± 4 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	4 ± 1	6 ± 1	22 ± 3	58 ± 3	63 ± 5	
10 mg.kg <sup>-1</sup> (n = 6)	PAS repos	132 ± 6	130 ± 8	78 ± 4	67 ± 2	70 ± 8	
	PAS max	136 ± 7	152 ± 7 <sup>a</sup>	128 ± 7 <sup>a</sup>	151 ± 5 <sup>a</sup>	150 ± 7 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	4 ± 1	20 ± 3 <sup>*</sup>	49 ± 4 <sup>*</sup>	84 ± 3 <sup>*</sup>	81 ± 8 <sup>*</sup>	
30 mg.kg <sup>-1</sup> (n = 5)	PAS repos	139 ± 4	144 ± 5	95 ± 12	76 ± 4	71 ± 5	
	PAS max	143 ± 5	148 ± 5	119 ± 10 <sup>a</sup>	150 ± 6 <sup>a</sup>	155 ± 9 <sup>a</sup>	
	ΔPAS	4 ± 1	5 ± 1 <sup>†</sup>	24 ± 5 <sup>†</sup>	74 ± 8 <sup>#</sup>	84 ± 9 <sup>#</sup>	

Anova par mesures répétées (effet traitement, p<0,0008) suivie par deux autres tests:

Test t de Student ; repos vs. max, a : p<0,02 et Anova deux facteurs (groupe/doses AVP) suivie d'un test Fisher *post hoc* ;

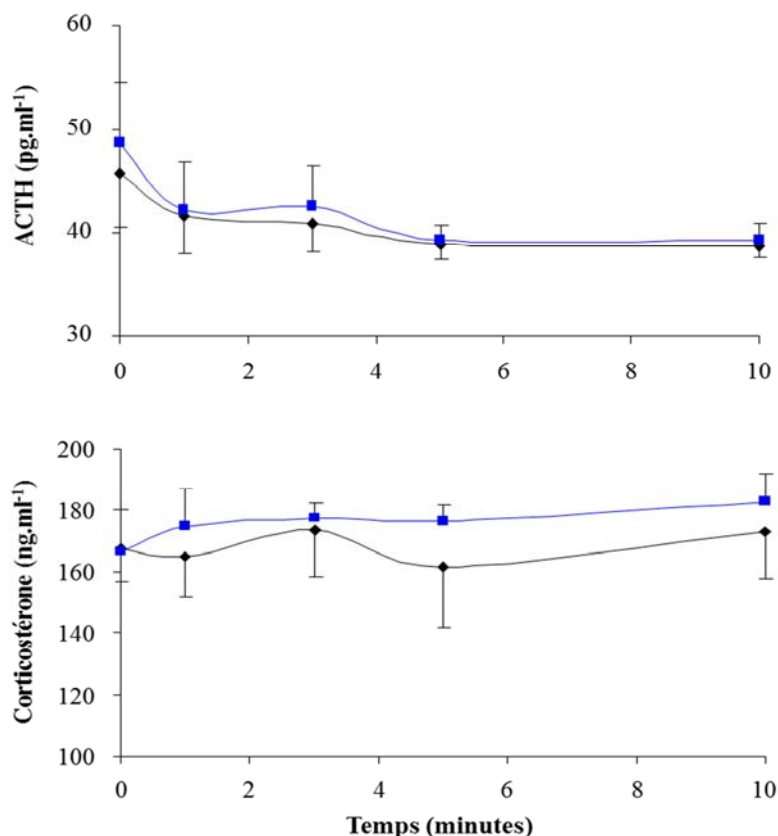
\* : contrôle vs. 10 mg/kg.24h<sup>-1</sup>, p<0,005 ; # : contrôle vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>, p<0,0001. PAS : Pression Artérielle Systolique (mmHg)





**Figure 1 : Effets d'un prétraitement par des antagonistes des récepteurs V1a ou V1b sur l'augmentation de pression artérielle induite par l'injection aigüe de doses croissantes de vasopressine chez le rat Sprague-Dawley**

Les valeurs en ordonnée représentent la différence de pression artérielle entre la valeur maximale atteinte après l'injection *i.v.* d'AVP et la valeur basale de repos. L'antagoniste V1a et l'antagoniste V1b ont été administrés chacun à deux doses différentes pendant 4 jours (10 et 30 mg.kg<sup>-1</sup>). Les rats contrôles n'ont reçu aucun prétraitement. ANOVA à un facteur (prétraitement) avec mesures répétées (doses AVP) : effet prétraitement,  $p=0,04$ ; effet AVP,  $p=0,0001$ ; interaction,  $p=0,02$ . ANOVA à un facteur suivie par un test Fisher *post hoc*: \* : contrôle vs. 10 mg/kg.24h<sup>-1</sup>,  $p<0,05$  ; # : contrôle vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>,  $p<0,04$  ; † : 10 vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>,  $p<0,03$ .  $n = 6$  et  $5$  rats par groupe, respectivement pour antagoniste V1b et V1a. PAS : Pression Artérielle Systolique. AUC : aire sous la courbe.



**Figure 2 : Effets du prétraitement par l'antagoniste des récepteurs V1b sur la stimulation de l'activité de l'axe HHS par la vasopressine chez le rat Sprague-dawley**

Evolution des concentrations plasmatiques d'ACTH et de corticostérone après injection aigüe de 300 ng.kg<sup>-1</sup> d'AVP chez des rats non-traités (contrôle, noir) ou prétraités pendant 4 jours avec un antagoniste V1b (30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>, bleu). ANOVA à un facteur (prétraitement) avec mesures répétées (temps) : effet prétraitement : ns ; effet temps, p=0,04 (ACTH). n = 5 rats par groupe.

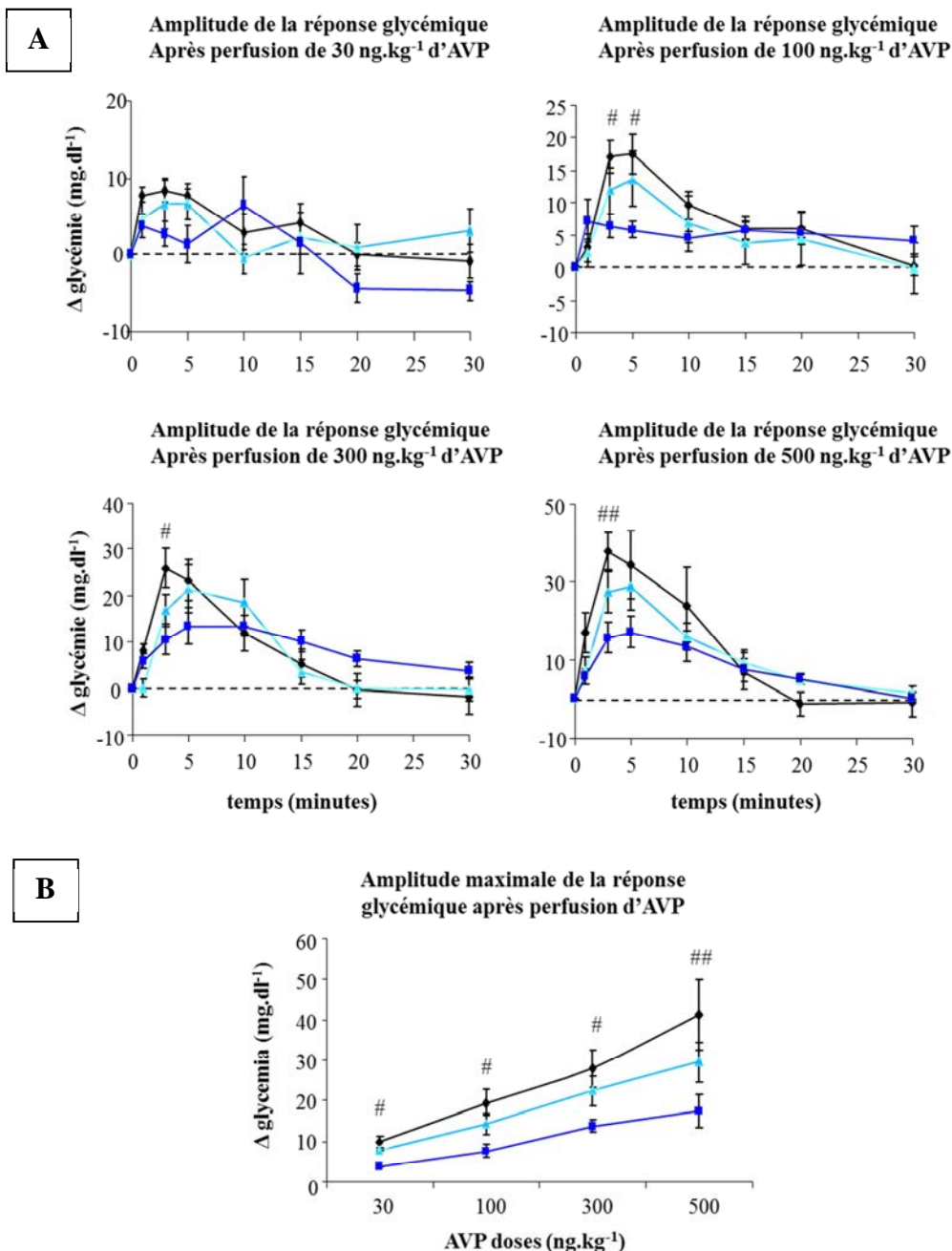
### **3. Conséquences de l'antagonisme des récepteurs V1a ou V1b sur la réponse hyperglycémique induite par l'injection aigüe de vasopressine**

Comme attendu, la vasopressine a induit une augmentation transitoire et dose-dépendante de la glycémie chez les rats contrôles. L'effet maximal survient dans les 3 à 5 minutes après la perfusion de vasopressine. Dans notre étude, la glycémie basale moyenne des rats contrôles est de 88 mg.dl<sup>-1</sup> (4,8 mmol.l<sup>-1</sup>). A la dose de 500 ng.kg<sup>-1</sup> de vasopressine, la glycémie maximale atteinte est en moyenne de 125 mg.dl<sup>-1</sup> (6,9 mmol.l<sup>-1</sup>) soit une augmentation de 37 mg.dl<sup>-1</sup> (2,1 mmol.l<sup>-1</sup>). Cette augmentation de la glycémie est du même ordre de grandeur que celle observée dans l'étude *in vivo* de Hems D.A et ses collaborateurs (1975). Ceux-ci avaient observé chez des rats Sprague-Dawley une élévation de la glycémie de 100 mg.dl<sup>-1</sup> (5 mmol.l<sup>-1</sup>) en réponse à une injection intrapéritonéale de 2 µg de vasopressine.

### Antagonistes des récepteurs V1a :

Le prétraitement de 4 jours avec l'antagoniste V1a n'a pas modifié significativement la glycémie basale mais a induit une inhibition de la réponse hyperglycémique vasopressinergique avec un effet dose-dépendant (**Figure 3**). Les doses de 10 et 30 mg.kg<sup>-1</sup> d'antagoniste V1a ont permis de diminuer respectivement de 27% et de 59% la réponse hyperglycémique à une injection de 500 ng.kg<sup>-1</sup> de vasopressine. Ces résultats suggèrent donc qu'à forte concentration, la vasopressine induit, via les récepteurs V1a, une augmentation de la glycémie. Nos travaux ne permettent pas de déterminer les mécanismes impliqués mais il est probable que ces effets très rapides soient médiés par des effets hépatiques sur la glycogénolyse et la gluconéogenèse (Hems D.A. et al, 1973, 1975 ; Whitton P.D. et al, 1978 ; Martin G. et Baverel G. 1984 ; Staddon J.M. et McGivan J.D. 1984, 1985). Des expériences supplémentaires de mesures de l'activité des enzymes clés intervenant dans l'une des deux voies métaboliques, 5 minutes après la perfusion de vasopressine, auraient été nécessaires afin d'élucider le mécanisme impliqué.

Il est intéressant de remarquer l'existence d'une différence d'efficacité du blocage par l'antagoniste V1a de l'effet hyperglycémiant et de l'effet hypertenseur de la vasopressine. Alors que l'effet anti-hyperglycémiant de l'antagoniste est dose-dépendant (plus marqué avec la dose 30 que la dose 10 mg.kg<sup>-1</sup>), les prétraitements par 10 ou 30 mg.kg<sup>-1</sup> induisent une inhibition de même amplitude de l'effet hypertenseur de la vasopressine. Ceci suggère que la biodisponibilité de l'antagoniste et/ou l'affinité de récepteurs vasculaires sont moindres que ceux des récepteurs hépatiques. Contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature, il est également possible que cet antagoniste est un effet incompétitif *in vivo* plutôt que compétitif. Dans notre laboratoire (Perucca J. et al, 2008b), nous avons montré que la vasopressine induisait ses effets rénaux dès une dose de 100 ng.kg<sup>-1</sup> (aucune dose inférieure n'a été testée). A cette même dose, nous montrons que la vasopressine dispose également d'effets métaboliques avec, notamment, une augmentation de la glycémie.



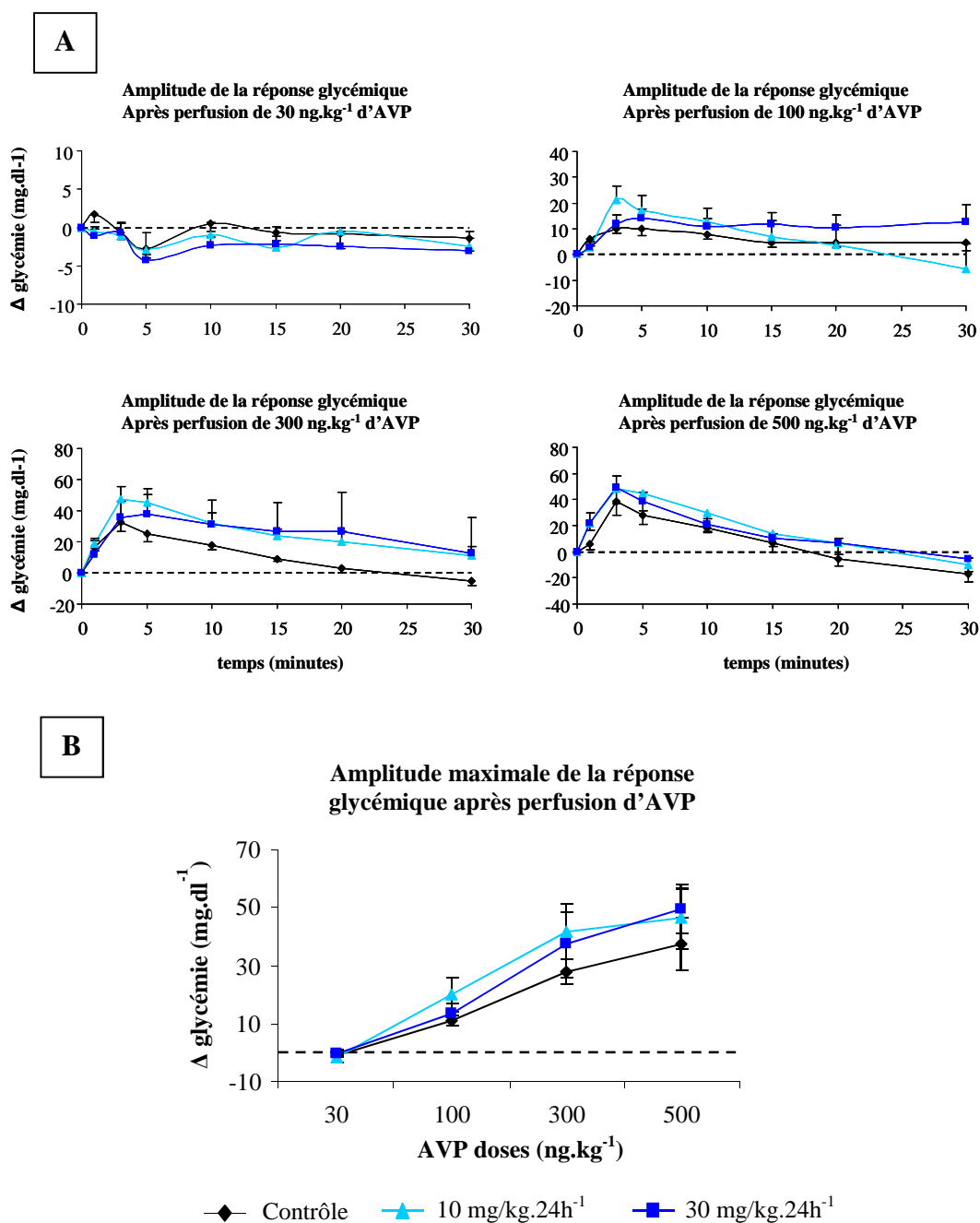
**Figure 3 : Cinétique de la réponse glycémique suivant l'injection de différentes doses de vasopressine après prétraitement avec l'antagoniste des récepteurs V1a chez le rat Sprague-Dawley**

L'antagoniste V1a (SR 49059) a été administré à deux doses différentes pendant 4 jours (10 et 30 mg/kg). Les rats contrôles n'ont reçu aucun prétraitement. A) Cinétiques de la réponse glycémique après injection aigue *i.v.* de différentes doses d'AVP. ANOVA à un facteur (prétraitement) avec mesures répétées (temps ou doses) : effet prétraitement :  $p < 0,05$  ; effet temps :  $p < 0,0001$  ; interaction :  $p < 0,001$  pour les doses 100, 300 et 500 ng.kg<sup>-1</sup> d'AVP. B) Courbes dose-réponse sur la réponse glycémique maximale. Les valeurs en ordonnée représentent la différence de glycémie entre la valeur maximale atteinte après l'injection d'AVP et la valeur basale. ANOVA à un facteur (prétraitement) avec mesures répétées (doses AVP) : effet prétraitement :  $p < 0,01$  ; effet doses AVP :  $p < 0,0001$  ; interaction : ns. Anova à un facteur suivie par un test Fisher *post hoc*, # :  $p < 0,01$  ; ## :  $p < 0,001$  (contrôle vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>). n = 6 par groupe.

### Antagonistes aux récepteurs V1b :

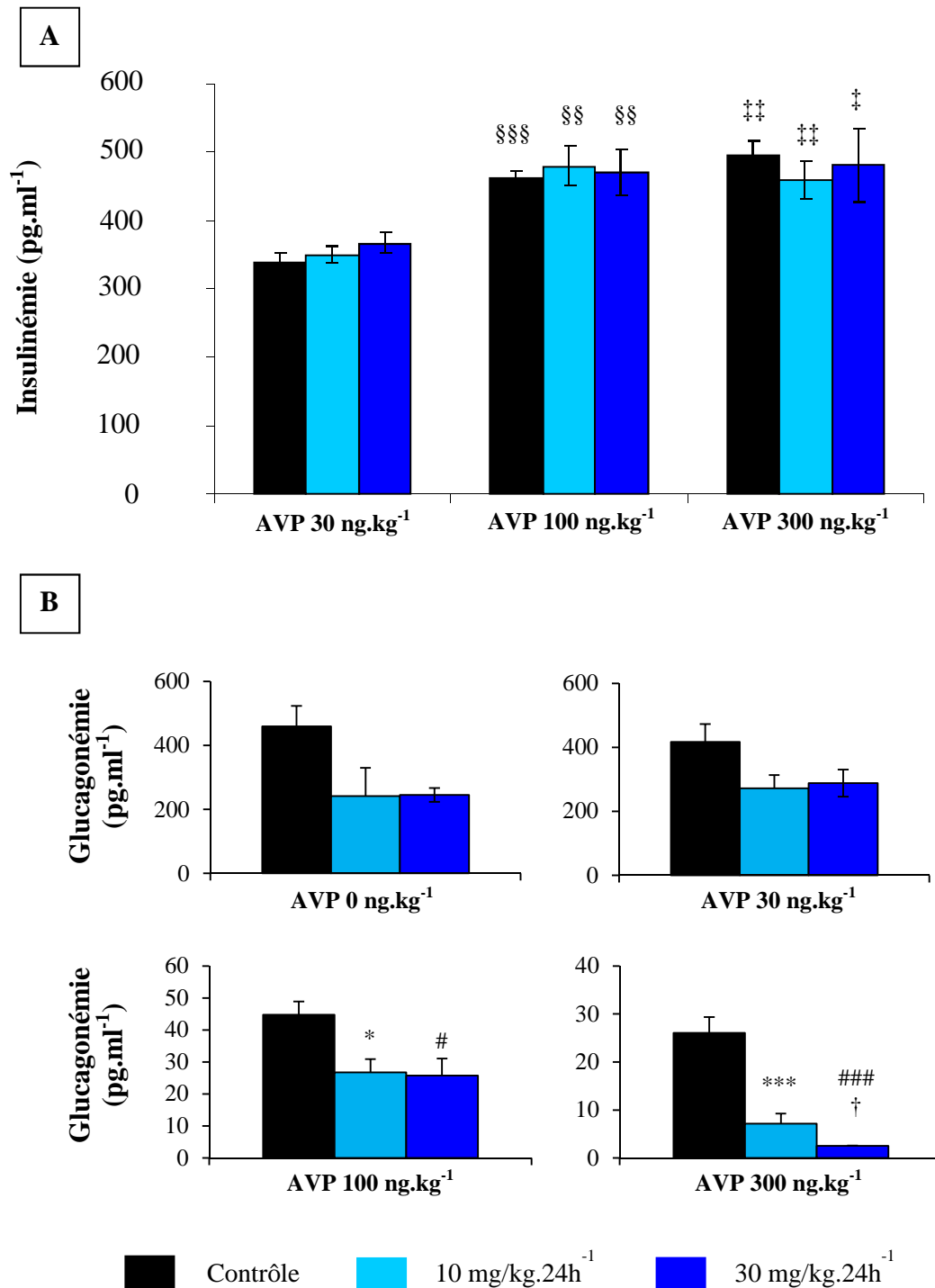
Le prétraitement avec l'antagoniste V1b n'a pas eu d'effet sur l'hyperglycémie induite par l'injection de vasopressine (**Figure 4**). Cependant les études précédentes sur pancréas isolé et perfusé ayant montré un effet médié par les récepteurs V1b sur la sécrétion de glucagon ou d'insuline suivant la glycémie ambiante (Abu-Basha E.A. et al, 2002), des dosages de ces deux hormones ont été effectués à différents temps après injection de vasopressine. Il est connu qu'une augmentation de la glycémie entraîne une augmentation de l'insulino-sécrétion et une diminution de la sécrétion de glucagon. Les résultats obtenus montrent, comme attendu, que sous l'action hyperglycémisante de la vasopressine, l'insulinémie augmente et la glucagonémie diminue chez les rats contrôles. Le prétraitement avec l'antagoniste V1b n'a pas eu d'effet sur la sécrétion d'insuline mais on observe une inhibition de la sécrétion de glucagon de manière dose-dépendante (**Figure 5**). A la dose de  $30 \text{ ng.kg}^{-1}$  de vasopressine, la réponse glucagonémique, pour chaque groupe de rat étudié, est similaire à celle observée en l'absence de perfusion de vasopressine. Ceci est en accord avec l'absence d'augmentation de la glycémie. Toutefois, l'antagoniste V1b tend à inhiber la sécrétion de glucagon pour ces deux doses ( $p < 0,06$ ). Aussi même lorsque la sécrétion de glucagon est effondrée après l'augmentation de  $30 \text{ mg.dl}^{-1}$  de la glycémie, induite par l'injection de  $300 \text{ ng.kg}^{-1}$  de vasopressine, un effet dose-dépendant de l'antagoniste est encore observé ( $26,0 \pm 3,3$  ;  $7,2 \pm 2,1$  et  $2,6 \pm 0,1 \text{ pg.ml}^{-1}$ , respectivement pour les doses 0, 10 et  $30 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$  d'antagoniste,  $p < 0,0001$ ).

Au vu des résultats obtenus *ex vivo* par Abu Basha E.A et ses collaborateurs, nous attendions que le traitement avec l'antagoniste V1b inhibe la sécrétion d'insuline induite par l'hyperglycémie aiguë due à la vasopressine, et à l'opposé, n'ait pas d'effet sur la sécrétion de glucagon. Toutefois, les résultats obtenus montrent le phénomène inverse. L'absence d'effet de l'antagoniste sur la sécrétion d'insuline peut être interprétée de deux manières : soit *in vivo* la vasopressine n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion d'insuline, d'autres stimuli plus puissants régulant cette sécrétion. Soit l'effet de l'antagoniste V1b est contrebalancé par d'autres systèmes comme le système nerveux parasympathique ou l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. La tendance à la diminution de la glucagonémie basale en présence d'antagoniste V1b et la potentialisation par l'antagoniste V1b de l'effet inhibiteur de l'hyperglycémie sur la sécrétion de glucagon suggèrent que les récepteurs V1b stimulent, en permanence, de façon modérée la production de glucagon par le pancréas dans les conditions physiologiques. A notre connaissance c'est la première fois qu'un tel effet de la vasopressine sur une des deux hormones majeures dans la régulation de la glycémie est démontré *in vivo*.



**Figure 4 : Cinétique de la réponse glycémique suivant l'injection de différentes doses de vasopressine après prétraitement avec l'antagoniste des récepteurs V1b chez le rat Sprague-Dawley**

L'antagoniste V1b (SR 149415) a été administré à deux doses différentes pendant 4 jours (10 et 30 mg/kg). Les rats contrôles n'ont reçu aucun prétraitement. A) Cinétique de la réponse glycémique après injection aigue *i.v.* de différentes doses d'AVP. B) Courbe dose-réponse sur la réponse glycémique maximale. Les valeurs en ordonnée représentent la différence de glycémie entre la valeur maximale atteinte après l'injection d'AVP et la valeur basale. Anova par mesures répétées : aucune différence significative. Anova à un facteur suivie par un test Fisher *post hoc*,  $p < 0,05$  considéré comme statistiquement significatif.  $n = 7$  rats par groupe.



**Figure 5 : Effets de l'antagoniste des récepteurs V1b sur la sécrétion des hormones pancréatiques chez le rat Sprague-Dawley**

Concentrations plasmatiques d'insuline (A) et de glucagon (B) mesurées au moment de la réponse glycémique maximale induite par l'injection aiguë d'AVP avec ou sans pré-traitement par l'antagoniste V1b (SR 149415). ANOVA à un facteur (prétraitement) avec mesures répétées (doses AVP) : effet doses :  $p < 0,0001$ . Anova à un facteur (prétraitement) fait dose par dose, suivie par un test Fisher *post hoc*. Contrôle vs. 10 mg/kg.24h<sup>-1</sup> : \*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,0001$  ; contrôle vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup> : #,  $p < 0,01$  ; ###,  $p < 0,0001$  ; 10 vs. 30 mg/kg.24h<sup>-1</sup> : †,  $p = 0,03$ . Test t de Student apparié : §§ :  $p < 0,001$  ; §§§ :  $p < 0,0001$  (30 vs. 100 ng.kg<sup>-1</sup>) ; ‡ :  $p < 0,05$ , ‡‡ :  $p < 0,001$  (30 vs. 300 ng.kg<sup>-1</sup>). n = 6 rats par groupe.

#### **4. Résumé**

Dans cette première partie de mon travail, j'ai montré les points suivants :

- Les récepteurs V1a modulent négativement les effets antidiurétiques de la vasopressine même lorsque la concentration plasmatique de vasopressine est physiologique. Les études précédentes avaient montré cet effet qu'en présence de concentrations élevées de vasopressine.
- La vasopressine administrée en aiguë induit des effets dose-dépendant sur la glycémie. Les études précédentes, datant de plus de 30 ans, n'avaient testé qu'une seule dose.
- Les effets hyperglycémiant de la vasopressine sont médiés par les récepteurs V1a. Seules des expériences *ex vivo* ou *in vitro* avaient été conduites jusqu'à présent.
- L'activation des récepteurs V1b ne modifie pas la sécrétion de l'insuline mais pourrait stimuler, en permanence et de façon modérée la production de glucagon par le pancréas. Toutefois, l'absence d'effet sur la sécrétion hormonale de l'axe HHS ne permet pas véritablement de statuer sur le rôle de ces récepteurs dans la régulation du métabolisme glucidique.

Ces données concernant les récepteurs de la vasopressine et la glycémie ont été obtenues en présence de doses élevées de vasopressine exogène. Toutefois, la concentration physiologique normale en vasopressine est de l'ordre du picomolaire. Il est établi que la vasopressine exerce des effets vasoconstricteurs pour une concentration nettement supérieure à celle conduisant à son effet antidiurétique (Liard J.F., 1984 ; Cowley A.W. Jr et Barber B.J., 1983). Cela soulève la question du rôle physiologique de la vasopressine sur l'homéostasie et le métabolisme glucidique. Les études 2 et 3 décrites dans ce mémoire tentent de répondre à cette question.



## ETUDE 2

---

# Rôle de la vasopressine sur le métabolisme glucidique chez le rat sain

### **I. Introduction**

En 1979, Zerby R.L et ses collaborateurs ont mis en évidence que les taux plasmatiques de vasopressine étaient 10 à 20 fois supérieurs chez 28 patients atteints d'un diabète de type I ou II par rapport à des sujets normoglycémiques. Cette observation a également été retrouvée dans des modèles animaux de diabète. Par ailleurs, il est connu que la sécrétion de vasopressine est inversement corrélée avec le niveau d'hydratation et une étude réalisée dans notre laboratoire (Roussel R. et al, 2011) a mis en évidence une association inverse entre la prise hydrique et le risque de développer une hyperglycémie dans la cohorte D.E.S.I.R issue de la population générale. Le but de ce travail a été de déterminer s'il existe un lien de causalité entre le taux plasmatique de la vasopressine et le risque d'apparition de troubles de l'homéostasie glucidique chez le rat sain. Pour cela, j'ai étudié les effets chroniques d'une concentration élevée de vasopressine ou d'une forte prise hydrique sur le métabolisme glucidique. Suite aux données obtenues au cours de la première étude, j'ai également testé l'effet d'un double traitement AVP/antagoniste V1a sur la réponse glycémique.

### **II. Matériel et méthodes**

#### **1. Traitements**

Deux séries d'expériences ont été menées, successivement, sur des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley. Les rats ont été placés en cage à métabolisme et après une période d'adaptation d'une semaine, ils ont été répartis en groupes de poids corporel et osmolalité urinaire comparables et soumis durant les 4 semaines suivantes à l'un des protocoles décrit ci-après.

Protocole 1 : effet d'une concentration élevée ou basse en vasopressine. Deux groupes de rats ont été étudiés.

- Groupe régime hydraté : les rats ont été traités avec un régime avec une forte teneur en eau afin d'augmenter leur prise hydrique et de réduire leur sécrétion endogène de vasopressine. La nourriture a été administrée sous forme de gel apportant 3 ml d'eau et 40 mg d'agar par gramme de nourriture.
- Groupe AVP : l'AVP ( $500 \text{ ng/kg.24}^{-1}$ ) a été administrée de façon chronique par minipompes osmotiques Alzet implantées intrapéritonéalement. La dose choisie a été déterminée lors d'une expérience préliminaire (**voir Annexe 2**). De la poudre d'agar a été mélangée à la nourriture afin qu'ils aient le même apport journalier en cette substance que le groupe précédent.

Protocole 2 : rôle des récepteurs V1a. Deux groupes de rats ont été étudiés.

- Groupe AVP : l'AVP ( $500 \text{ ng/kg.24}^{-1}$ ) a été administrée de façon chronique par minipompes osmotiques Alzet implantées intrapéritonéalement.
- Groupe AVP/antagoniste V1a : ce groupe a reçu un double traitement vasopressine ( $500 \text{ ng/kg.24}^{-1}$ )/antagoniste V1a ( $30 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$ ). L'AVP est administrée par minipompe. Comme pour les expériences de l'étude 1, l'antagoniste V1a a été administré par voie orale, mélangé à la nourriture. Le traitement avec l'antagoniste a démarré 1 semaine après celui de la vasopressine.

Durant toute l'expérience, les rats avaient un accès libre à l'eau mais étaient légèrement restreints en nourriture ( $20 \text{ g.24h}^{-1}$ ).

## **2. Paramètres plasmatiques et urinaires mesurés**

Des bilans en cages à métabolisme et des prises de sang ont été effectués avant, puis toutes les deux semaines après le début des traitements afin de vérifier qu'ils n'induisaient pas de déséquilibre hydrique (déshydratation ou expansion volémique). Des recueils urinaires et des pesées ont été réalisés sur deux périodes successives de 24 heures afin de mesurer la prise de poids corporel, la prise alimentaire, la prise hydrique et le débit urinaire. Les prélèvements sanguins ont été effectués, à la queue, le premier jour avant la mise en cage à métabolisme. Les paramètres suivants ont été mesurés : osmolalité urinaire et plasmatique (freezing point osmometer, Roebling, Berlin, Germany), concentration urinaire en créatinine et urée (Konelab 201, Thermo Electron Corp., Illkrich, France), en sodium et potassium (photomètre de

flamme, modèle 243, Instrumentation Laboratory, France) et en albumine (Kit Elisa, Euromedex, France). La glycémie, après 6 heures de jeûne, a été déterminée à l'aide d'un glucomètre (One Touch® Vita TM, LifeScan, France) sur des échantillons sanguins de 2 µl prélevés à la queue. L'hématocrite a été évalué après centrifugation d'un échantillon sanguin (50 µl) dans un tube capillaire hépariné (Vitrex Medical, Danemark).

### **3. Exploration du métabolisme glucidique**

Au cours des traitements, des tests de tolérance au glucose (1,5 g glucose/kg poids corporel) et à l'insuline (1 ou 0,25 U insuline/kg poids corporel) ont été effectués après 6 heures de jeûne par une injection intrapéritonéale. Les tests sont effectués à deux jours d'intervalle. La glycémie est mesurée aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'injection de glucose ou d'insuline. La concentration plasmatique en insuline, au cours du GTT, a été déterminée par une méthode Elisa (Mercodia, Uppsala, Suède) sur des échantillons prélevés aux temps 0, 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après l'administration de glucose.

### **4. Pression artérielle et fréquence cardiaque**

Des mesures de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ont été effectuées, pour le protocole 2, afin de s'assurer que le traitement avec l'antagoniste V1a n'induisait pas de modifications cardio-vasculaires. Les mesures ont été réalisées par pléthysmographie (Blood Pressure System Analysis, Model BP-2000, Visitech System, USA) sur animaux éveillés tout le long de la 3<sup>ème</sup> semaine après le début des traitements. Les rats sont placés dans une enceinte à 37°C pendant 10 minutes puis disposés sur une plaque chauffante (37°C) dans une cage à contention. La taille de la cage à contention est choisie en fonction du poids corporel du rat. Leur queue est introduite dans un ballonnet (générant une pression) et placée au-dessus d'un capteur de mesures de pression artérielle et de fréquence cardiaque. Afin d'obtenir des valeurs reproductibles et limiter le stress des rats, les trois premiers jours sont consacrés à la période d'adaptation aux conditions de prises de mesures. Les deux jours suivants, la pression artérielle est mesurée 10 fois de suite. Les valeurs obtenues sont moyennées pour chaque jour puis pour les deux jours pour chaque rat.

## **5. Analyse d'expression de gènes**

A la fin de l'expérience, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (*i.p.* 60 mg.kg<sup>-1</sup>) et des échantillons de foie et de muscles soléaires ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à l'analyse quantitative des ARNm.

Les ARN totaux sont isolés au TRIzol (Life Technologies, St Aubin, France) et les ADNc correspondant sont obtenus par transcription inverse (Superscript-II, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Une PCR en temps réel est effectuée à partir d'une quantité d'ADNc équivalent à 15 ng d'ARN sur un appareil ABI PRISM (modèle 7000, Applied Biosystems®, Life Technologies, St Aubin, France) en utilisant des amorces et des sondes TaqMan spécifiques (TaqMan Universal Master Mix). Les gènes analysés sont la PhosphoEnolPyruvate Carboxykinase (Pck1), la glucose-6 phosphatase (G6pc), la glycogène phosphorylase hépatique (Pygl), les transporteurs au glucose de type 2 et 4 (Slc2a2 et Slc2a4). Les données sont normalisées à partir de l'ARN ribosomique 18S et calculées par la méthode comparative  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

## **6. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques, entre le groupes de rats, ont été établies par un test t non-apparié de Student. Le niveau de significativité choisie était de  $p < 0,05$ .

### **III. Résultats et discussion**

#### **1. Effets chroniques de la vasopressine et de l'activation des récepteurs V1a sur les fonctions rénale et cardiovasculaire**

Comme dans toutes les autres expériences décrites dans ce mémoire, nous avons analysé les effets chroniques des différents traitements sur la fonction rénale. Le détail de toutes les données recueillies à différents temps après le début des traitements est fourni dans les **annexes 3 et 4**. Les tableaux ci-après résument les données les plus importantes.

Comme attendu, le protocole 1 a induit des différences majeures de l'activité de concentration urinaire entre les deux groupes de rats (**Tableau 3**). Les rats sous régime hydraté ont un débit urinaire 3 fois plus élevé et une osmolarité urinaire 3 fois plus faible que les rats traités par la vasopressine, ces différences visibles à 2 semaines, se maintiennent après 4 semaines de traitement. Aucune différence significative d'osmolalité plasmatique, de natrémie ou d'hématocrite n'a été décelée entre les 2 groupes à 4 semaines de traitement. Cela indique que les animaux sur le long terme arrivent à maintenir un équilibre hydrique correct. Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que l'activité de concentration urinaire était associée à une augmentation de la filtration glomérulaire (Bouby N. et al, 1996). Nous ne retrouvons pas cette association dans la présente étude. Par contre, comme démontré précédemment par l'équipe (Bardoux P. et al, 2003a), nous retrouvons ici une augmentation de l'excrétion urinaire d'albumine induite par un taux élevé de vasopressine, l'excrétion urinaire d'albumine étant 1,4 fois plus élevée chez les rats traités par l'AVP par rapport aux rats sous régime hydraté.

**Tableau 3 : Paramètres physiologiques des rats Sprague-Dawley après 4 semaines de traitement avec un régime hydraté ou une perfusion chronique de vasopressine**

		Régime hydraté (n=7)			AVP (n=7)		
Poids corporel	g	295	±	3	320	±	5 ***
Prise hydrique	g.24h <sup>-1</sup>	53,1	±	0,5	20,4	±	0,9 ***
Hématocrite	%	44,6	±	1,9	45,2	±	0,8
<b>Concentrations plasmatiques</b>							
Osmolalité	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	306	±	1	307	±	3
Sodium	mmol.L <sup>-1</sup>	142	±	1	140	±	1
Potassium	mmol.L <sup>-1</sup>	5,6	±	0,4	5,7	±	0,4
Urée	mmol.L <sup>-1</sup>	3,6	±	0,2	4,1	±	0,3
<b>Urine</b>							
Débit urinaire	ml.24h <sup>-1</sup>	39,9	±	1,5	12,2	±	0,7 ***
Osmolalité urinaire	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	505	±	15	1769	±	93***
TcH <sub>2</sub> O	ml.24h <sup>-1</sup>	27,1	±	1,7	58,6	±	1,4 ***
Excrétion d'osmoles	mosm.24h <sup>-1</sup>	20,1	±	0,7	21,2	±	0,4
Excrétion de sodium	mmol.24h <sup>-1</sup>	2,22	±	0,10	2,39	±	0,07
Excrétion de potassium	mmol.24h <sup>-1</sup>	2,39	±	0,06	2,88	±	0,05***
Excrétion d'urée	mmol.24h <sup>-1</sup>	9,53	±	0,29	9,79	±	0,32
Excrétion d'albumine	µg.24h <sup>-1</sup>	49,5	±	3,8	70,5	±	3,9 ***

Test t de Student non-apparié, \*\*\* : AVP vs. Régime hydraté, p<0,0001

Le double traitement AVP/antagoniste V1a (protocole 2) n'a pas induit de différence significative dans les paramètres urinaires excepté une très légère augmentation de la réabsorption de l'eau libre (**Tableau 4**), ce qui est à nouveau en faveur d'un effet contre-régulateur des récepteurs V1a sur l'effet antidiurétique exercé par les récepteurs V2 comme déjà vu dans l'Etude 1. L'adjonction de l'antagoniste V1a au traitement par l'AVP n'a pas induit non plus de déséquilibre hydrique comme le montre la stabilité des paramètres plasmatiques.

**Tableau 4: Paramètres physiologiques des rats Sprague-Dawley après 4 semaines de traitement avec une perfusion chronique de vasopressine en présence ou non d'un antagoniste des récepteurs V1a**

		AVP (n=7)		AVP + antagoniste V1a (n=8)	
Poids corporel	g	269	± 3	266	± 2
Prise hydrique	g.24h <sup>-1</sup>	21,9	± 1,5	20,2	± 1,2
Hématocrite	%	49,3	± 1,0	48,6	± 0,3
<b>Concentrations plasmatiques</b>					
Osmolalité	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	293	± 2	290	± 1
Sodium	mmol.L <sup>-1</sup>	147	± 1	147	± 2
Potassium	mmol.L <sup>-1</sup>	4,8	± 0,2	5,5	± 0,7
Urée	mmol.L <sup>-1</sup>	3,9	± 0,4	4,5	± 0,4
<b>Urine</b>					
Débit urinaire	ml.24h <sup>-1</sup>	10,3	± 1,5	11,7	± 1,1
Osmolalité urinaire	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	1870	± 238	1845	± 150
T <sup>c</sup> H <sub>2</sub> O	ml.24h <sup>-1</sup>	47,4	± 1,6	56,2	± 1,0***
Excrétion d'osmoles	mosm.24h <sup>-1</sup>	17,3	± 0,6	20,3	± 0,5***
Excrétion de sodium	mmol. 24h <sup>-1</sup>	1,47	± 0,05	1,70	± 0,05*
Excrétion de potassium	mmol. 24h <sup>-1</sup>	2,49	± 0,16	2,74	± 0,13**
Excrétion d'urée	mmol. 24h <sup>-1</sup>	4,75	± 0,98	5,43	± 0,70
Excrétion d'albumine	µg. 24h <sup>-1</sup>	36,8	± 3,3	46,7	± 2,2*

Test de t de Student, \*p<0,05; \*\* p< 0,01; \*\*\*p<0,001

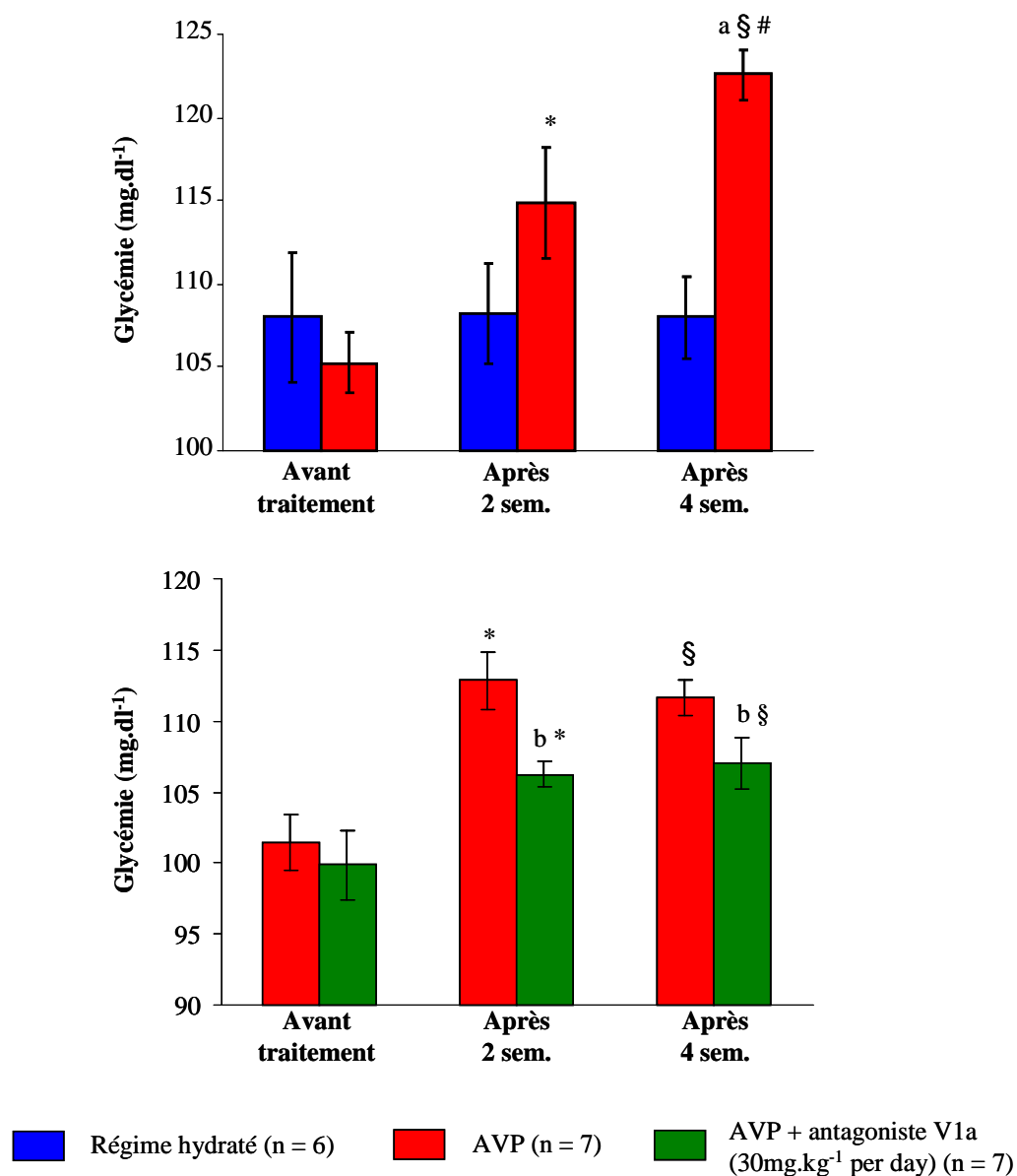
Au cours de l'Etude 1, nous avons montré qu'un prétraitement de 4 jours par un antagoniste V1a ne modifiait pas la pression artérielle basale mesurée par voie sanglante sur animal anesthésié. Dans cette étude nous avons mesuré la pression artérielle à la queue sur animal vigile. Bien que les valeurs soient un peu hautes, nous n'avons pas observé de différence de pression artérielle entre les groupes AVP et AVP/antagoniste V1a ( $148 \pm 2$  vs.  $160 \pm 8$  mmHg, respectivement). Les fréquences cardiaques étaient également similaires entre les deux groupes ( $353 \pm 9$  vs.  $359 \pm 9$  BPM). Ces données renforcent le concept que la vasopressine ne joue pas de rôle majeur via les récepteurs V1a sur la régulation à long terme de la pression artérielle comme décrit dans l'introduction générale.

## **2. Effets chroniques de la vasopressine et de l'activation des récepteurs V1a sur le métabolisme glucidique**

### **Protocole 1 :**

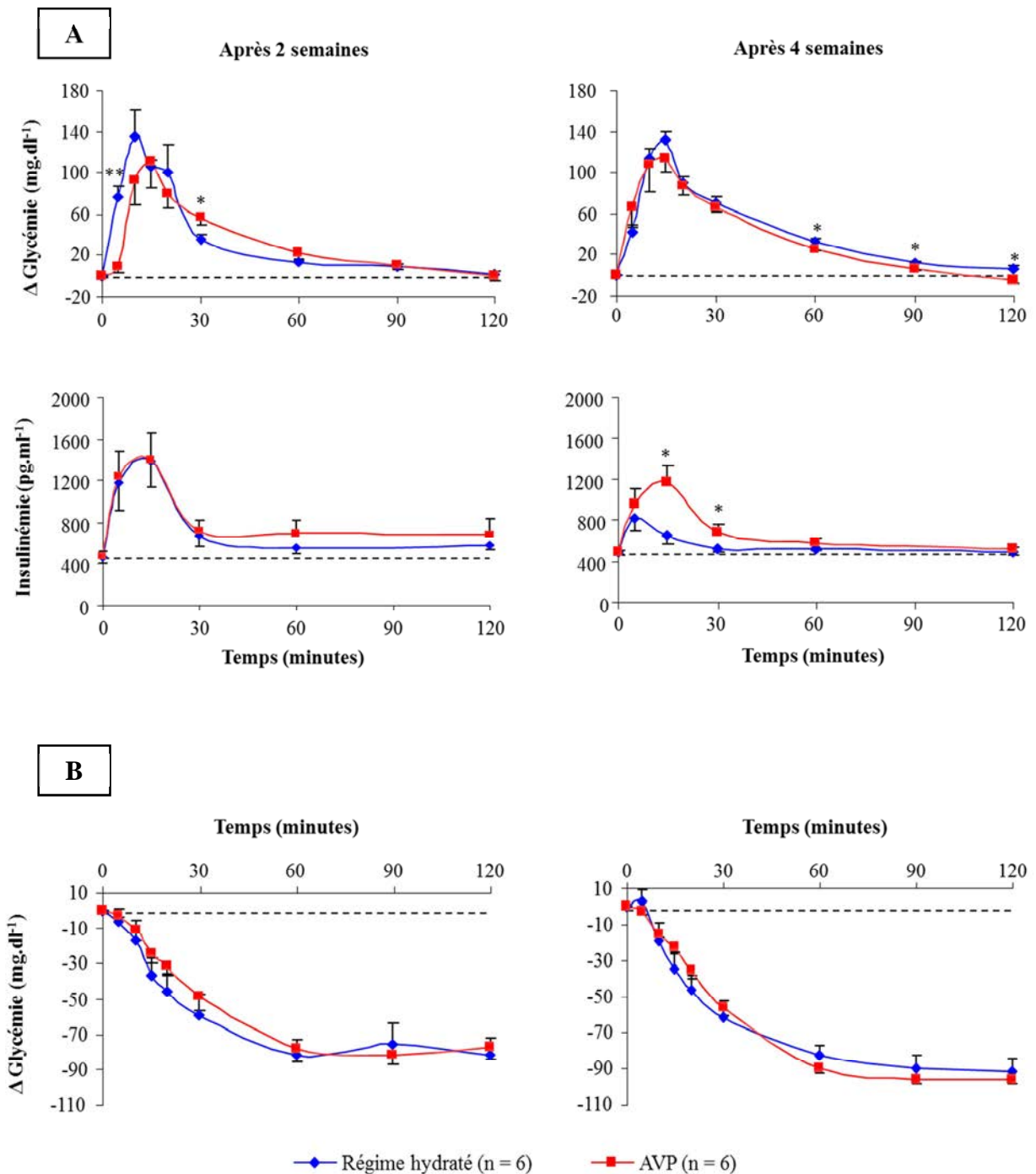
Le traitement chronique par l'AVP a induit une augmentation significative de la glycémie à jeun sans modification de l'insulinémie. Cette augmentation de glycémie est plus marquée à 4 semaines de traitement qu'à 2 semaines (+ 20 et +10 mg.dl<sup>-1</sup> respectivement, par rapport à la valeur avant traitement). Le régime hydraté n'a pas modifié la glycémie à jeun (**Figure 6**). Au cours des tests de tolérance au glucose, les traitements n'ont pas entraîné de variations notables de réponse glycémique que ce soit après 2 ou 4 semaines de traitement. A l'état basal, avant injection de glucose, l'insulinémie à jeun était similaire dans les deux groupes de rats. A 2 semaines de traitement, les réponses insulinémiques au cours du GTT sont identiques dans les deux groupes étudiés mais à 4 semaines la réponse insulinémique des rats sous régime hydraté a diminué d'intensité par rapport à la semaine 2 alors que la réponse insulinémique reste inchangée dans le groupe vasopressine (**Figure 7**). Ce résultat pourrait suggérer une augmentation de la sensibilité à l'insuline par le régime hydraté mais cette hypothèse n'est pas confortée par les résultats des ITT au cours desquels la réponse hypoglycémique est de même amplitude dans les deux groupes de rats après 2 ou 4 semaines de traitement. Il est possible que la dose d'insuline injectée (1 U.kg<sup>-1</sup>) ait été trop forte et qu'une dose plus faible d'insuline aurait permis de mettre en évidence des différences de réponse à l'ITT entre les deux groupes.





**Figure 6 : Effets chroniques de la vasopressine sur la glycémie à jeûn chez le rat Sprague-Dawley et implication des récepteurs V1a**

(A) Comparaison de rats nourris avec un régime hydraté ou recevant une perfusion chronique d'AVP (500 ng/kg.24h<sup>-1</sup>). (B) Comparaison de rats recevant une perfusion chronique d'AVP combinée ou non avec un antagoniste des récepteurs V1a (30 mg/kg.24h<sup>-1</sup>). Anova à un facteur avec mesures répétées : effet traitement,  $p < 0,002$  ; effet temps,  $p < 0,03$  ; interaction,  $p < 0,03$ . Test t de Student non-apparié, a : Régime hydraté vs. AVP,  $p < 0,0003$  ; b : AVP seule vs. AVP + antagoniste V1a,  $p < 0,03$ . Test t de Student apparié, \* : 2 sem. vs. avant traitement,  $p < 0,01$  ; § : 4 sem. vs. avant traitement,  $p < 0,007$  ; # : 4 sem. vs. 2 sem.,  $p = 0,03$ ,



**Figure 7 : Conséquences des différents traitements induisant un taux bas ou élevé de vasopressine sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez le rat Sprague-Dawley**

Après 2 semaines et 4 semaines de traitement avec un régime hydraté ou une perfusion chronique de vasopressine, les rats à jeun depuis 6h sont soumis à un test de tolérance au glucose ( $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ , *i.p.*) (A) ou à l'insuline ( $1 \text{ U.kg}^{-1}$ , *i.p.*) (B). Anova à un facteur (traitement) avec mesures répétées (temps) : effet traitement,  $p=\text{ns}$  ; effet temps,  $p<0,0001$  ; interaction,  $p=0,02$ . Test t de Student non-apparié : Régime hydraté vs. AVP, \* :  $p<0,05$  ; \*\* :  $p=0,001$ .

## Protocole 2 :

Tout comme dans le protocole 1, la vasopressine a induit une augmentation significative (+ 11 mg.dl<sup>-1</sup> par rapport à la valeur avant traitement) de la glycémie à jeun. Le co-traitement pendant 2 semaines avec l'antagoniste V1a a permis de limiter partiellement l'augmentation de la glycémie induite par la vasopressine (**Figure 6**). Il a également induit une diminution de moitié de l'expression du gène du glycogène phosphorylase hépatique (GPase) (**Tableau 5**). Nos résultats n'ont pas montré de différence entre les groupes dans la réponse glycémique au cours du GTT alors que la réponse insulinémique au cours du GTT et l'hypoglycémie au cours du l'ITT sont plus marquées chez les rats sous antagoniste V1a (**Figure 8**). Cela suggère que l'antagoniste V1a augmente la résistance à l'insuline.

**Tableau 5 : Niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogénèse ainsi que des gènes codant pour les transporteurs au glucose.**

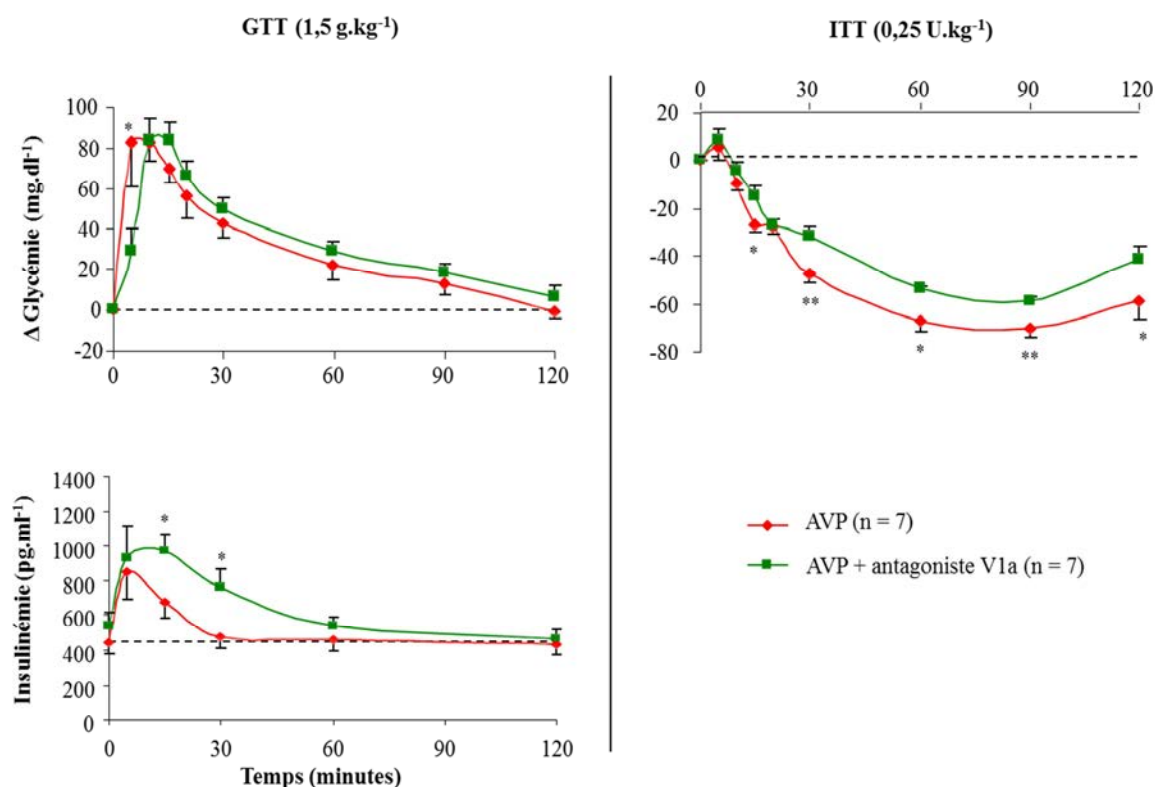
	Muscle soléaire		Foie			
	Glut 4	GPase	Glut 2	GPase	G6Pase	PEPCK
AVP (n = 4)	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,19	1,00 ± 0,18	1,00 ± 0,12	1,00 ± 0,26	1,00 ± 0,28
AVP + Antagoniste V1a (n = 4)	2,12 ± 0,88	4,05 ± 2,51	0,73 ± 0,10	0,49 ± 0,11 b	0,83 ± 0,05	1,04 ± 0,27

Les valeurs sont rapportées aux valeurs du groupe AVP pour chaque gène contrôlé.

Test t de Student non-apparié : b, p = 0,01 (comparaison des groupes)

GPase : Glucose Phosphorylase ; G6Pase : Glucose-6 Phosphatase ; PEPCK : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase ;

Glut 2 et 4 : transporteur au glucose 2 et 4



**Figure 8 : Effet de l'antagonisme des récepteurs V1a sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez des rats Sprague-Dawley traités par de la vasopressine**

Après 4 semaines de traitement avec une perfusion chronique de vasopressine combinée ou non avec un antagoniste V1a, les rats à jeûn depuis 6h sont soumis à un test de tolérance au glucose (1,5 g.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*) ou à l'insuline (0,25 U.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*). Anova à un facteur (traitement) avec mesures répétées : effet traitement,  $p = \text{ns}$  ; effet temps,  $p < 0,0001$  ; interaction,  $p = 0,001$ . Test t de Student non-apparié : AVP vs. AVP + antagoniste V1a, \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p = 0,005$ .

Cette étude a montré pour la première fois que les taux circulants de vasopressine influence à long terme la glycémie à jeun. Une concentration élevée de vasopressine augmente la glycémie et cet effet est partiellement réversé par un antagoniste des récepteurs V1a. Des doses plus fortes d'antagoniste auraient été nécessaires pour déterminer si cet effet de la vasopressine est médié uniquement par les récepteurs V1a ou fait intervenir d'autres mécanismes. Les résultats présentés dans l'Etude 3 sur une autre souche de rats montreront que cet effet « hyperglycémiant » de la vasopressine peut être totalement annulé par un antagoniste V1a. Ces résultats en faveur d'un effet « hyperglycémiant » de l'activation des récepteurs V1a ne sont pas en accord avec les observations faites par Aoyagi T. et ses collaborateurs (2007) sur des souris KO-V1a. Ces souris KO-V1a présentent une glycémie plus élevée que des souris sauvages, particulièrement lorsqu'elles ne sont pas à jeun.

Cependant, il est à noter que ces souris présentent une diminution de la pression artérielle (Koshimizu T.A. et al, 2006) et ont des valeurs de concentration plasmatique de vasopressine, d'urémie et d'hématocrite supérieures à celles de souris sauvages suggérant l'existence d'une contraction volémique ce qui n'est pas le cas pour nos rats.

Les études menées précédemment sur les effets aigus de la vasopressine avaient montré *in vivo* (Hems D.A. et al, 1973 ; 1975), sur foie isolé perfusé, ou sur hépatocytes en culture (Howl J. et al, 1991) que la vasopressine, via ses récepteurs V1a, stimule la glycogénolyse en augmentant l'activité de la glycogène phosphorylase hépatique. La diminution de l'expression de la glycogène phosphorylase chez les rats traités par l'antagoniste V1a est en accord avec ces anciennes données et montre que cet effet peut se maintenir à long terme.

Nos résultats concernant les GTT et ITT sont troublants. La baisse de réponse insulinémique durant le GTT dans le protocole 1 chez les rats sous régime hydraté semble indiquer une amélioration de la sensibilité à l'insuline lorsque les taux circulants de vasopressine sont bas. Dans l'expérience (protocole 2) visant à étudier les effets de l'antagoniste V1a, nous nous attendions également à obtenir les mêmes résultats que sous le traitement avec un régime hydraté. Cependant, nos résultats ont montré que l'antagoniste V1a conduisait à une très légère résistance à l'insuline. Au début des années 2000, il a été démontré que la vasopressine était capable d'induire la sécrétion d'insuline pancréatique par ses récepteurs V1b (Abu-Basha E.A. et al, 2002) mais également qu'elle pouvait stimuler la voie de signalisation de l'insuline, par l'intermédiaire de la PI3K, en activant le récepteur EGF (Ghosh P.M. et al, 2001). En revanche, Hiroyama M. et ses collaborateurs (2006) ont montré une baisse de la signalisation insulinémique chez des souris KO-V1a. Nos résultats obtenus avec l'application d'un antagoniste aux récepteurs V1a sont ainsi en accord avec les travaux précédents.

### **3. Résumé**

L'apport original de cette étude est qu'une concentration élevée de vasopressine augmente à long terme la glycémie et cet effet est partiellement reversé par un antagoniste des récepteurs V1a. La diminution de la glycogénolyse hépatique est probablement impliquée dans les effets de l'antagoniste V1a. Les résultats concernant des anomalies de tolérance au glucose sont peu clairs. Ces données nous ont amenés à explorer les conséquences du taux circulant de vasopressine dans un modèle de pré-diabète, le rat Zucker obèse.

# Rôle de la vasopressine sur le métabolisme glucidique chez les rats Zucker Lean et Obèses

### **I. Introduction**

Suite aux résultats de l'étude 2 montrant que la vasopressine pouvait favoriser l'hyperglycémie, nos travaux ont eu pour but d'étudier les conséquences à long terme de la vasopressine sur le développement des altérations du métabolisme glucidique dans un modèle de syndrome métabolique, le rat Zucker obèse. Comme mentionné dans l'introduction générale depuis le début des années 2000 et faisant suite à la possibilité de dosage de la copeptine (biomarqueur de la sécrétion vasopressinergique, Morgenthaler N.G. et al, 2006), des associations positives ont été mises en évidence entre les taux de copeptine et la survenue d'un diabète sucré, l'apparition d'une hyperglycémie, le développement de la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique (Saleem U. et al, 2009, Enhörning S. et al, 2010, 2011, 2013 ; Roussel R. et al, 2011 ; Abbasi A. et al, 2012). Toutefois, ces études cliniques ne permettent pas de déterminer s'il existe un lien de causalité entre la vasopressine et l'altération du métabolisme glucidique.

Différents modèles animaux sont disponibles pour reproduire le syndrome métabolique. Parmi ceux-ci, figurent les modèles génétiques basés sur l'invalidation de la voie de la leptine. Ces modèles illustrent la résistance à la leptine observée chez des patients obèses même si chez l'homme, rares sont les cas où cette résistance est liée à une mutation. Les modèles de syndrome métabolique induit par l'alimentation semblent plus représentatifs de la pathogénèse de ce syndrome chez l'homme. Cependant, l'apport calorique (notamment en graisse) nécessaire pour entraîner des troubles métaboliques doit être supérieur chez le rongeur, car ces modèles animaux sont beaucoup moins sensibles, que l'homme, à l'apparition des troubles métaboliques. Pour notre étude, nous avons donc choisi de travailler sur le rat Zucker.

Les rats Zucker sont une souche de rat chez laquelle il a été observé un phénotype obèse lié à une mutation spontanée. Cette mutation a été nommée fatty ou fa (Zucker T.F. et Zucker L.M., 1963). Cette mutation autosomale récessive, située au niveau du codon 269 du gène du récepteur à la leptine, entraîne un changement d'acide aminé (glutamine remplacée par une proline) et la production d'une protéine tronquée sur sa partie extracellulaire (Iida M. et al, 1996a et 1996b ; Takaya K. et al, 1996). La mutation du récepteur à la leptine entraîne une diminution de l'affinité de son ligand et une altération de la transduction du signal. En conséquence, cela entraîne une perte de l'effet anorexigène de la leptine avec une hyperphagie et une diminution de la dépense énergétique générant l'obésité.

Nous avons étudié les effets de la vasopressine sur le rat Zucker obèse (fa/fa) mais également sur le rat contrôle correspondant : Zucker Lean. Cependant, le nombre d'animaux utilisé étant trop important, nous avons étudié ces deux génotypes séparément. L'étude 3 est consacrée à l'étude des effets de la vasopressine et des récepteurs V1a sur le métabolisme glucidique des rats Zucker Lean. Comme nous le verrons ultérieurement, cette étude permettra de vérifier que les observations faites chez les rats Sprague-Dawley peuvent être reproduite sur une autre souche de rats sains. Les travaux chez les rats Zucker obèses sont présentés dans l'étude 4. Dans cette étude, un groupe de rats Zucker Lean a également été intégré afin de s'assurer du phénotype des rats obèses et afin de voir si l'abaissement des concentrations plasmatiques de vasopressine, par un régime hydraté, pouvait les rapprocher du phénotype des rats Zucker Lean.

## **II. Matériel et méthodes**

### **1. Animaux et traitements**

Les expériences ont été menées sur des rats mâles Zucker Lean et obèses, âgés de 6 semaines (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). Les rats ont été placés en cage à métabolisme et après une période d'adaptation d'une semaine, ils ont été répartis en différents groupes de poids corporel, osmolalité urinaire et glycémie à jeun comparables et soumis durant les 4 semaines suivantes à l'un des traitements décrit ci-après.

#### Etude 3 :

4 groupes Lean : régime hydraté, contrôle, AVP et AVP + antagoniste V1a (SR 49059)

#### Etude 4 :

3 groupes obèses : régime hydraté, contrôle, AVP et 1 groupe Lean

- Groupe régime hydraté : les rats ont été traités avec une forte teneur en eau afin d'augmenter leur prise hydrique et de réduire leur sécrétion endogène de vasopressine. Pour cela et comme dans l'étude 2, la nourriture a été administrée sous forme de gel apportant 3 ml d'eau et 40 mg d'agar par gramme de nourriture.
- Groupes Contrôle et Lean: les rats n'ont subi aucun traitement et ils ont été considérés comme le groupe disposant d'une concentration plasmatique en vasopressine physiologiquement normale.
- Groupe AVP : l'AVP ( $500 \text{ ng/kg.24h}^{-1}$ ) a été administrée de façon chronique par minipompes osmotiques Alzet implantées intrapéritonéalement de façon à augmenter la concentration plasmatique de vasopressine.
- Groupe AVP/Antagoniste V1a : les rats ont reçu un double traitement vasopressine ( $500 \text{ ng/kg.24h}^{-1}$ ) /antagoniste V1a ( $30 \text{ mg/kg.24h}^{-1}$ ). L'AVP est administrée par minipompe. Comme pour l'étude 2, l'antagoniste V1a a été administré par voie orale, mélangé à la nourriture. Le traitement avec l'antagoniste V1a a débuté 3 jours avant celui de la vasopressine.

Durant toute l'expérience, les rats avaient un accès libre à l'eau mais comme dans toutes les expériences décrites dans ce mémoire, ils ont été légèrement restreints en nourriture ( $20 \text{ g.24h}^{-1}$  chez les Lean et  $25 \text{ g.24h}^{-1}$  chez les obèses). Plusieurs séries de rats, traités comme indiqués ci-dessus, ont été nécessaires pour effectuer les expériences décrites ci-après.

Remarque : Chez les rats Zucker obèses, j'ai également étudié l'implication des récepteurs V1a par l'utilisation de l'antagoniste SR 49059. Les résultats ne sont pas présentés dans mon mémoire car l'expérience est toujours en cours de réalisation.

## **2. Paramètres urinaires et plasmatiques**

Des bilans en cages à métabolisme et des prises de sang ont été effectués avant, puis toutes les deux semaines après le début des traitements afin de vérifier qu'ils n'induisaient pas de déséquilibre hydrique. Des recueils urinaires et des pesées ont été réalisés sur deux périodes successives de 24 heures afin de mesurer la prise de poids corporel, la prise alimentaire, la prise hydrique et le débit urinaire. Les prélèvements sanguins ont été effectués, à la queue, le premier jour avant la mise en cage à métabolisme. Les paramètres suivants ont été mesurés : osmolalité urinaire et plasmatique, concentration urinaire et plasmatique en créatinine, urée, sodium, potassium. L'hématocrite a été évalué après centrifugation d'un échantillon sanguin



(50 µl) à l'aide d'un tube capillaire hépariné. La vasopressine urinaire a été mesurée par radioactivité comme décrit précédemment (Bichet D. et al, 1987), le produit de dégradation des catécholamines urinaires (VMA) a été déterminé par la technique d'HPLC et l'albuminurie urinaire a été évaluée par un test Elisa (Assaypro, St Charles, Missouri, USA). La glycémie, après 6 heures de jeûne, a été déterminée à l'aide d'un glucomètre (One Touch® Vita TM, LifeScan, France) sur des échantillons sanguins de 2 µl prélevés à la queue. L'insulinémie et la glucagonémie à jeun ont été mesurées sur des échantillons plasmatiques par Elisa (Mercodia, Uppsala, Suède). Tryglérides, Cholestérol total et HDL plasmatiques ont été évalués sur un analyseur automatique (Konelab 201, Thermo Electron Corp., Illkirch, France) et l'apeline par une méthode Elisa (Phoenix Pharmaceutical, Burlingame, CA).

### **3. Pression artérielle et fréquence cardiaque**

Des mesures de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ont été effectuées chez les rats Zucker Lean afin de s'assurer que le traitement avec l'antagoniste V1a n'induisait pas de modifications cardio-vasculaires. Les mesures ont été réalisées, comme précédemment, par pléthysmographie (Blood Pressure System Analysis, Model BP-2000, Visitech System, USA) sur animaux éveillés tout le long de la 3<sup>ème</sup> semaine après le début des traitements. La non-adaptation des cages de contention à la taille des rats Zucker obèses a compromis l'obtention de mesures fiables de pression artérielle chez ces rats.

### **4. Exploration du métabolisme glucidique**

#### **a. Tests de tolérance au glucose et à l'insuline**

Après 2 et 4 semaines de traitement, des tests de tolérance au glucose (1,5 g glucose/kg poids corporel) et à l'insuline (1 U insuline/kg poids corporel) ont été effectués après 6 heures de jeûne par une injection intrapéritonéale. Sur une période de 2 heures, la glycémie est mesurée aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'injection de glucose ou d'insuline. Les concentrations plasmatiques en insuline et en glucagon, au cours du GTT et ITT respectivement, sont déterminées par une méthode Elisa (Mercodia, Uppsala, Suède) sur des échantillons sanguins prélevés aux temps 0, 5, 15, 30, 60 et 120 minutes après l'administration de glucose ou d'insuline.

## **b. Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique**

Cette technique a été réalisée en collaboration avec Mr Magnan Christophe.

### **Principe :**

Le Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique est la méthode de référence pour quantifier la résistance à l'insuline. Il consiste à perfuser de l'insuline à une concentration et un débit continu et à empêcher la glycémie de baisser en perfusant du glucose. La quantité de glucose perfusée est une estimation de la quantité de glucose utilisée par les tissus insulino-dépendants, sous l'action d'une concentration définie d'insuline. La mesure des flux de glucose, par perfusion de glucose marqué aux isotopes stables, fait la part de ce qui est hépatique et périphérique dans la résistance à l'insuline. Les paramètres mesurés sont le débit de perfusion de glucose (GIR : Glucose infusion Rate), le taux de captation de glucose (GU : Glucose Uptake) dans les tissus périphériques insulino-dépendants et la portion de glucose produite par le foie et les reins (EGP : Endogeneous Glucose Production). Dans le contexte d'un Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique, en perfusant du glucose à un débit variable en même temps que l'insuline, on maintient une glycémie stable. Toutefois, cela n'empêche pas l'insuline d'agir sur ses organes cibles pour induire la captation de glucose. Ainsi, si les rats sont résistants à l'insuline, le GIR et le GU doivent être plus faibles et inversement pour les rats sensibles à l'insuline.

### **Préparation chirurgicale :**

Une semaine avant la réalisation du Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique, les rats ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Kétamine ( $86 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) et de Xylazine ( $13,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). En condition aseptique (Novaclav<sup>®</sup>), une incision a été réalisée au niveau supérieur de la clavicule gauche afin de visualiser la veine jugulaire. Un cathéter (Thycon S3, VWR, France) pré-rempli avec une solution saline héparinée y a été implanté puis extériorisé au niveau de la nuque en passant par voie sous-cutanée. Après sa fixation, le cathéter a été rempli avec une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP) afin d'éviter tout reflux sanguin. A la fin de la chirurgie, un anti-inflammatoire a été injecté par voie intrapéritonéale (Kétofène). Le jour de la réalisation du Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique, les rats ont été placés en cage individuelle et raccordés, via le cathéter, au système permettant la réalisation du clamp en les laissant libres de leur mouvement. A 8h00, les rats sont mis à jeun pendant une période de 6 heures.

### Protocole du Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique :

Après un jeun de 6h (8h à 14h), les rats reçoivent un bolus de 20 mU d'insuline humaine (Actrapid, Novo, Copenhagen, Danemark) dissoute dans une solution saline et de 4  $\mu\text{Ci}$  de d- $(^3\text{H})$ -glucose, suivie d'une perfusion continue d'insuline à 2 mU/kg.min<sup>-1</sup> et du d- $(^3\text{H})$ -glucose (0,33  $\mu\text{Ci/kg.min}^{-1}$ ) à un débit constant de 40  $\mu\text{l.min}^{-1}$ . L'euglycémie était maintenue par une perfusion de glucose 20%. Pendant toute l'expérience, la glycémie est mesurée, toutes les 20 minutes avec un glucomètre (One Touch® Vita TM, LifeScan, France) sur des échantillons sanguins de 2  $\mu\text{l}$  prélevés à la queue. Après 2 heures de perfusion, quand un équilibre glycémique est atteint, des recueils sanguins sont effectués après 3 périodes de 10 minutes successives afin de mesurer les concentrations plasmatiques de glucose et de déterminer l'activité spécifique du d- $(^3\text{H})$ -glucose. Pour la détermination de l'activité du d- $(^3\text{H})$ -glucose, les échantillons sanguins sont déprotéinés avec du  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  et du  $\text{ZnSO}_4$  et le surnageant est évaporé à température ambiante, sous hotte aspirante, pendant 24h. Le résidu sec est ensuite dissous dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau auquel on rajoute 10 ml de liquide scintillant. Le niveau de la radioactivité est déterminé par un détecteur de rayon  $\beta$  (Packard Tri-Carb 460C, PerkinElmer, Connecticut, USA).

### Calculs :

A l'état d'équilibre basal, l'EGP (Ra) est égale au GU (Rd). Le GU est calculé par la formule :  $\text{Rd} = \text{Ra} = \text{débit de d-}(^3\text{H})\text{-glucose perfusé (désintégration/min)} / \text{l'activité spécifique de glucose sanguin (désintégration/mg)}$ . Durant le clamp,  $\text{Rd} = \text{Ra} + \text{Ra}'$  soit la quantité de glucose nécessaire pour maintenir un état euglycémique.

En pratique, on détermine, le GIR moyen durant les 3 périodes successives de 10 minutes qu'on multiplie par la concentration de glucose perfusé pour maintenir la glycémie. Ensuite, on rapporte la valeur en kg de poids corporel ( $\text{mg glucose /min.kg}^{-1}$ ).

Le GU est calculé par l'activité spécifique du glucose (D) sanguin divisé par la moyenne de l'activité spécifique de glucose mesurée sur les 3 échantillons sanguins recueillis (RAS), le tout ramené en kilogramme de poids corporel ( $\text{mg glucose /min.kg}^{-1}$ ). Le RAS est déterminé en divisant l'activité spécifique moyenne des 3 échantillons sanguins recueillis par la glycémie moyenne (mM). Au final,  $\text{GU} = \text{D} / \text{RAS}$ . L'EGP est calculée par la formule :  $\text{EGP} = \text{GU} - \text{GIR}$ .

### **c. Test du 2-DOG 6 P**

#### **Principe :**

Le 2-DOG est une molécule de glucose dont le groupement hydroxyle en position 2 est remplacé par une molécule d'hydrogène. Lié à cette modification, le 2-DOG est capable de passer à travers les cellules par l'intermédiaire des transporteurs au glucose mais il ne subira pas la glycolyse (Kurtoglu M. et al, 2007). En revanche, il sera métabolisé, par l'hexokinase, en 2-DOG 6-phosphate et c'est sous cette forme que nous obtenons une indication sur le niveau de captation de glucose dans un tissu donné.

#### **Protocole :**

Après un jeun de 6h (8h à 14h), les rats reçoivent un bolus de 2-deoxy-( $^3\text{H}$ )-glucose (25 Ci/mmol, 25  $\mu\text{Ci/rat}$ , CEA, Saclay, France) injecté dans 100  $\mu\text{l}$  de solution saline. Au temps 10, 20, 30 et 60 minutes après l'injection, des échantillons sanguins sont collectés pour déterminer la glycémie et l'activité spécifique du 2-deoxy-( $^3\text{H}$ )-glucose. Les rats sont ensuite anesthésiés avec du pentobarbital sodique (*i.p.* 60  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) et les tissus (foie, les tissus adipeux viscéral, épidydimaire et sous-cutané, les muscles squelettiques soléaire et EDL (Extensor Digitorum Longus)) sont récupérés et directement congelés dans de l'azote liquide jusqu'à la détermination de leur contenu en 2-deoxy-( $^3\text{H}$ )-glucose 6-phosphate. Le test du 2-DOG 6-phosphate a également été effectué après un clamp euglycémique hyperinsulinémique. La détermination du niveau de radioactivité du 2-deoxy-( $^3\text{H}$ )-glucose 6-phosphate, dans les échantillons plasmatiques s'effectue suivant le même protocole que précédemment pour le d-( $^3\text{H}$ )-glucose. Pour les tissus ( $\approx 100 \text{ mg}$ ), une étape préalable de digestion est nécessaire et est réalisée par l'incubation des tissus dans du NaOH (1N) à 60°C pendant 1h puis 500  $\mu\text{l}$  de HCL (1N) est ajouté afin de stopper l'action du NaOH. Sur un échantillon (foie par exemple), 200  $\mu\text{l}$  de tissu digéré est ajouté dans 1 ml de  $\text{HClO}_4$  (Acide Perchlorique 6%, Sigma-Aldrich, St Quentin, France) permettant de quantifier le 2-DOG total et 200  $\mu\text{l}$  dans 1 ml de  $\text{Ba(OH)}_2 / \text{ZnSO}_4$  permettant de quantifier le 2-DOG non 6-phosphate. Après centrifugation, 800  $\mu\text{l}$  de chaque surnageant ( $\text{HClO}_4$  et  $\text{Ba(OH)}_2 / \text{ZnSO}_4$ ) est utilisé pour la détermination du niveau de radioactivité comme décrit pour le d-( $^3\text{H}$ )-glucose.

#### Calculs :

Après avoir déterminé l'activité spécifique dans chaque échantillon plasmatique recueilli, on rapporte cette activité en mg de glucose (activité (cpm.ml<sup>-1</sup>) / glycémie (mg.ml<sup>-1</sup>)) et on calcul l'intégral de l'activité du 2-deoxy-(<sup>3</sup>H)-glucose 6-phosphate (Ferré P et al, 1985).

Pour déterminer la valeur d'activité (cpm) dans les tissus, on fait la différence entre l'activité présente dans le surnageant HClO<sub>4</sub> et celle présente dans le tube Ba(OH)<sub>2</sub> /ZnSO<sub>4</sub>, qu'on rapporte ensuite en milligramme de tissu puis qu'on divise par la valeur de l'intégrale. On obtient une quantité de 2-DOG 6-phosphate en mg de glucose/mg de tissu.min<sup>-1</sup>.

#### **d. Test de tolérance au pyruvate**

Dans des conditions de jeûne, deux processus hépatiques interviennent pour limiter la chute de la glycémie : la glycogénolyse et la gluconéogénèse à partir de substrats non-carbohydratés tel que le lactate et le pyruvate. La réponse glycémique à l'injection de pyruvate est donc un reflet de la néoglucogénèse hépatique.

Le test de tolérance au pyruvate a été réalisé sur les rats Zucker Obèses à jeun (6h) après 2 semaines de traitements. Une solution de pyruvate de sodium (1 g.kg<sup>-1</sup>) a été injectée par voie intrapéritonéale et la glycémie a été mesurée aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'injection.

#### **5. Mesure de la composition corporelle**

Les pourcentages en masse grasse et en masse maigre ont été mesurés sur les animaux éveillés par imagerie à résonnance magnétique (EchoMRI 900, Houston, TX).

## **6. Analyse de l'expression génique par RT-qPCR**

A la fin de l'expérience, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (*i.p.* 60 mg.kg<sup>-1</sup>) et des échantillons de foie ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à l'analyse quantitative des ARNm.

L'expression des gènes de la PhosphoEnolPyruvate Carboxykinase (Pck1 ; PEPCCK), la glucose-6 phosphatase (G6pc ; G6Pase), la glycogène phosphorylase hépatique (Pygl ; GPase), les transporteurs au glucose de type 1, 2 et 4 (SLC2A1, 2 et 4 ; GLUT 1, 2 et 4) ainsi que l'expression du gène codant pour l'aquaglycéroporine 9 (AQP9) ont été quantifiées comme précédemment par la technique Taqman. L'expression des gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique (ATF4, ATF6, CHOP et TRB3) ainsi que ceux de la lipogénèse et de la synthèse du cholestérol (SREBP1-c, SREBP-2 et FAS), en collaboration avec l'équipe de Mme Foufelle Fabienne (UMRS 1138, Paris), ont été analysées en utilisant le système de détection MyiQ (BioRad, Marnes-la-coquette, France) et le kit de détection au SYBR<sup>®</sup> Green (qPCR Core Kit, Eurogentec, Angers, France). L'ensemble des amorces spécifiques de rats, pour les gènes étudiés, ont été choisies par le logiciel Primer Express (Version 1.0, Applied Biosystems<sup>®</sup>). Les données sont normalisées à partir de l'ARN ribosomique 18S et calculées par la méthode comparative 2<sup>-ΔΔCT</sup>.

## **7. Analyses histologiques**

A la fin de l'expérience, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (*i.p.* 60 mg.kg<sup>-1</sup>) et des échantillons de foie ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C et utilisés pour une analyse histopathologique. 5 μm de coupes de foie ont été colorés par la méthode hématoxyline/éosine ou le rouge Sirius. L'examen histologique a été réalisé, en aveugle, en collaboration avec l'équipe de Mme Paradis Valérie (anatomo-pathologiste spécialiste des maladies du foie, Hôpital Beaujon, Paris). La stéatose, la nécro-inflammation et la fibrose portale et périsinusoïdale ont été analysées par microscopie.

## **8. Analyses biochimiques hépatiques.**

Les contenus en glycogène, cholestérol et triglycérides hépatiques ont été effectués en collaboration avec l'équipe de Mme Fougelle Fabienne. Le contenu hépatique en triglycérides et cholestérols a été déterminé par l'utilisation d'un kit commercial (Randox Laboratories, Crumlin, UK). Le contenu hépatique en glycogène a été déterminé comme décrit par Bergmeyer H.U. (1974). Brièvement, 100 mg de tissu de foie sont homogénéisés dans 0,2 M de tampon acétate et incubés en présence de l' $\alpha$ -(1-4),(1-6)-amylglucosidase (Roche Diagnostics, Meylan, France) pendant 1h à 55°C. La quantité de glucose libérée a ensuite été mesurée par un test enzymatique spectrophotométrique.

## **9. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques, entre les groupes de rats, ont été établies par une analyse de variance à un ou deux facteur(s) avec des mesures répétées. Les ANOVA ont été suivies, quand cela était approprié, par un test de Fisher *post hoc*. Le niveau de significativité choisi était de  $p < 0,05$ . Les rats obèses et Lean sont comparés séparément.

### **III. Résultats et discussion**

#### **1. Caractéristiques des rats obèses et Lean**

Comme attendu, nous avons retrouvé chez les rats obèses les anomalies métaboliques qui les caractérisent à savoir des valeurs des concentrations plasmatiques d'acides gras non-estérifiés, de triglycérides et de cholestérol plus élevées que les rats Lean, ainsi qu'une insulïnémie à jeun augmentée, une insulino-résistance et une intolérance au glucose tout en ayant une glycémie normale (Ferré P. et al, 1986 ; Berthiaume N. et al, 2003).

#### **2. Effets des différents traitements sur les fonctions rénales et cardiovasculaires**

Le détail de toutes les données recueillies à différents temps après le début des traitements est fourni en **annexes 5** (Etude 3) et **6** (Etude 4). Les **tableaux 6 et 7** ci-après résument les données les plus importantes.

##### **Validation du protocole :**

Afin de valider notre protocole expérimental visant à modifier les taux circulants de vasopressine, nous avons mesuré l'excrétion urinaire de celle-ci. Le stress et l'hémorragie étant des stimuli puissants de sécrétion de vasopressine, il est très difficile de déterminer les valeurs réelles physiologiques de concentrations plasmatiques de vasopressine parce qu'elles sont souvent proches de la limite de détection. Nous avons donc choisi de mesurer l'excrétion urinaire de vasopressine d'une part, car elle est 50 à 100 fois plus concentrée que dans le plasma et, d'autre part, il a été montré que l'excrétion urinaire de vasopressine est proportionnelle aux valeurs plasmatiques quand l'excrétion osmolaire reste stable (Robertson G.L, 1976).

Comme attendu, les rats Lean ou les rats obèses avec un régime hydraté ont une excrétion de vasopressine effondrée, inférieure à  $2 \text{ pg.24h}^{-1}$  soit environ 10 fois moins que les rats contrôles correspondants. Les rats ayant une minipompe d'AVP ont une excrétion de vasopressine nettement augmentée (10 à 20 fois plus élevée) par rapport aux groupes contrôles. Ces différences de taux de vasopressine ne s'accompagnent pas de déséquilibre hydrique puisque aucune différence significative d'osmolalité plasmatique, de natrémie ou encore d'hématocrite n'a été observée entre les groupes de rats après 4 semaines de traitement.



### Fonction rénale :

Le régime hydraté a induit chez les rats Lean et chez les rats obèses une augmentation d'un facteur 5 environ du débit urinaire et une diminution significative de l'osmolalité urinaire qui est cependant restée à des valeurs hyperosmotiques par rapport au plasma. Ces variations reflètent une diminution de l'activité de concentration urinaire comme l'atteste les valeurs de réabsorption d'eau libre ( $T_cH^2O$ ). Par contre, il pourrait paraître étonnant que malgré une vasopressinémie plus haute, les rats traités avec l'AVP ne présentent pas de valeurs de concentration urinaire plus élevées ou de débit urinaire plus faibles que les rats contrôles. Cette absence d'effet peut être attribué au fait que l'activité de concentration urinaire des rats est déjà à son niveau maximal. Des expériences précédentes menées dans l'équipe avaient montré que l'augmentation de la concentration urinaire était dépendante de la dose de vasopressine perfusée mais que cet effet atteint une valeur plateau (Bankir L., 2001a ; Bardoux P. et al, 2003a). En présence de l'antagoniste V1a, l'effet de la vasopressine sur l'activité de concentration urinaire chez les rats Lean tend à diminuer mais de façon non significative.

Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que la vasopressine par ses effets V2 augmente la filtration glomérulaire et l'albuminurie chez le rat sain et joue un rôle majeur dans la dégradation de la fonction rénale (estimée par les valeurs d'excrétion urinaire d'albumine et de filtration glomérulaire) dans des modèles d'insuffisance rénale chronique ou de néphropathie diabétique (Bouby N. et al, 1990, 1996 ; Bardoux P. et al, 1999, 2003a, 2003b). Ces données expérimentales ont d'ailleurs été confirmées récemment chez l'homme (Velho G. et al, 2013). Dans l'étude 4, nous montrons que l'excrétion urinaire d'albumine est déjà 6 fois plus haute chez le rat Zucker obèse âgé de 12 semaines que chez le rat Lean (Tableau 7) et qu'un taux de vasopressine élevé augmente encore plus cette albuminurie alors qu'un taux bas, la diminue. Ces résultats confortent les données acquises précédemment et suggèrent que le syndrome métabolique constitue non seulement un risque cardiovasculaire mais également rénal.

**Tableau 6 : Paramètres physiologiques des rats Zucker Lean après 4 semaines de traitement**

	Régime hydraté (n = 8)	Contrôle (n = 7)	AVP (n = 7)	AVP + antagoniste V1a (n = 7)
Poids corporel	299 ± 8	302 ± 9	295 ± 8	301 ± 9
Prise hydrique	63,5 ± 0,7	17,3 ± 0,5***	18,6 ± 0,6***	18,6 ± 0,3***
Hématocrite	47,2 ± 1,7	45,3 ± 2,1	48,3 ± 2,5	47,6 ± 1,7
<b>Concentrations plasmatiques</b>				
Osmolalité	307 ± 2	306 ± 2	304 ± 3	308 ± 3
Sodium	144 ± 1	140 ± 3	144 ± 1	146 ± 3
Potassium	5,5 ± 0,5	5,3 ± 0,3	6,0 ± 0,4	5,4 ± 0,4
Urée	5,2 ± 0,2	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,3	4,8 ± 0,4
<b>Urine</b>				
Débit urinaire	33,8 ± 1	7,4 ± 0,6***	7,6 ± 0,9***	7,9 ± 1,1***
Osmolalité urinaire	489 ± 19	2520 ± 134***	2413 ± 174***	2257 ± 187***
T <sup>c</sup> H <sub>2</sub> O	21,2 ± 2,0	53,6 ± 3,0***	51,5 ± 3,1***	47,7 ± 3,1***
Excrétion d'osmoles	16,5 ± 0,7	18,3 ± 1,0	17,7 ± 1,1	16,7 ± 1,2
Excrétion de sodium	1,60 ± 0,01	1,90 ± 0,14	2,01 ± 0,15	1,79 ± 0,12
Excrétion de potassium	2,18 ± 0,13	2,41 ± 0,27	2,31 ± 0,21	2,33 ± 0,25
Excrétion d'urée	9,50 ± 0,25	10,60 ± 0,46	10,36 ± 0,52	10,83 ± 0,54
Excrétion d'AVP	1,5 ± 0,2†††	10,8 ± 1,6	262 ± 37†††***	226 ± 30†††***
Excrétion de VMA	332 ± 23	135 ± 33***	136 ± 30***	112 ± 32***

Anova à un facteur (traitement) suivie par un test de Fisher post hoc : Régime hydraté vs. autres groupes : \*\*\*, p<0,0001 ; Contrôle vs. autres groupes : †††p<0,0001 ; AVP vs. Contrôle : +, p<0,01

**Tableau 7 : Paramètres physiologiques des rats Zucker obèses après 4 semaines de traitement**

		Lean (n = 5)		Régime hydraté (n = 6)		Contrôle (n = 6)		AVP (n = 6)	
Poids corporel	g	291	= 11	402	= 7***	388	= 11***	363	= 9***†
Prise hydrique	ml.24h <sup>-1</sup>	21,1	= 1,8†††	96	= 3	21,7	= 1,8†††	20,8	= 2,0†††
Hématocrite	%	45,5	= 1,0	43,4	= 1,1	42,7	= 1,2	44,0	= 2,2
Concentrations plasmatiques									
Osmolalité	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	287	= 2	291	= 1	292	= 1	291	= 2
Sodium	mmol.L <sup>-1</sup>	137	= 2	141	= 1	140	= 1	139	= 2
Potassium	mmol.L <sup>-1</sup>	5,7	= 0,2	5,5	= 0,1	5,5	= 0,2	6,0	= 0,4
Urée	mmol.L <sup>-1</sup>	4,8	= 0,2	6,2	= 0,3**	5,8	= 0,2*	6,7	= 0,4***
Urine									
Débit urinaire	ml.24h <sup>-1</sup>	7,0	= 0,6†††	52,5	= 4,3	9,5	= 0,4†††	9,1	= 0,3†††
Osmolalité urinaire	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	2360	= 142	619	= 27***	2687	= 82***††	2711	= 95***††
T <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	ml.24h <sup>-1</sup>	46,9	= 2,0	55,1	= 5,0	75,6	= 3,4***††	73,3	= 3,5***††
Excrétion d'osmoles	mosm.24h <sup>-1</sup>	16,2	= 0,7	32,3	= 2,4***	25,5	= 1,1***†	24,7	= 1,1**†
Excretion de sodium	mmol. 24h <sup>-1</sup>	2,02	= 0,11	2,45	= 0,08*	2,96	= 0,18***†	2,93	= 0,13***†
Excretion de potassium	mmol. 24h <sup>-1</sup>	2,45	= 0,17	3,77	= 0,16***	3,36	= 0,16***	3,21	= 0,10***†
Excretion d'urée	mmol. 24h <sup>-1</sup>	8,25	= 0,49	16,68	= 1,16***	14,04	= 0,69***†	13,34	= 0,51***†
Excrétion d'albumine	µg.24h <sup>-1</sup>	118	= 18	255	= 38**	731	= 98***††	1334	= 366***††
Excretion d'AVP	ng.24h <sup>-1</sup>	7,9	= 1,0####†††	0,9	= 0,3###	14,3	= 1,8####†††*	96,6	= 13,1

Anova à un facteur (effet traitement) suivie par un test de Fisher post hoc :

Lean vs : autres groupes : \*, p<0,01 ; \*\*, p<0,001, \*\*\*, p<0,0001 ; AVP vs. autres groupes : ###, p<0,0001 ;

Régime hydraté vs. autres groupes : †, p<0,01 ; ††, p<0,001 ; †††p<0,0001

### Fonction vasculaire :

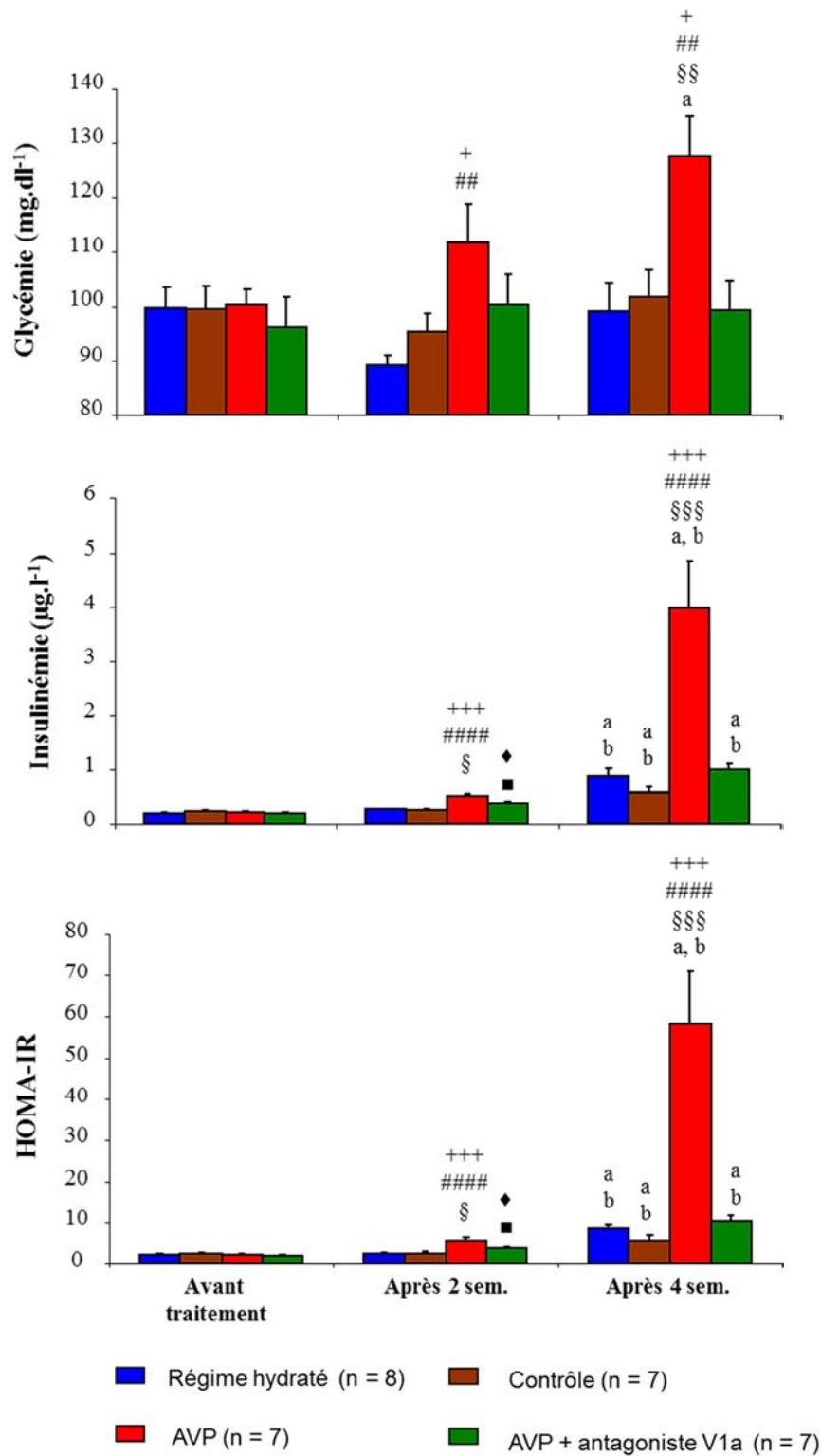
Au cours de l'étude précédente sur les rats Sprague-Dawley, nous avons montré que la vasopressine et l'antagoniste V1a ne jouaient pas un rôle majeur dans la régulation à long terme de la pression artérielle. Dans cette étude sur une autre souche de rat, nous confirmons cette observation. Les différents traitements n'ont pas entraîné de modifications sur les paramètres cardiovasculaires analysés durant toute la durée de l'Etude 3. Des problèmes techniques (voir Matériel et Méthodes) ne nous ont pas permis de mesurer la pression artérielle chez les rats obèses.

Montó F et ses collaborateurs (2014) ont montré que les rats Zucker obèses ne développent pas d'hypertension entre 13 et 18 semaines d'âge. Or dans notre étude, nous avons travaillé sur des rats âgés de 12 semaines. Nous ne pouvons pas exclure totalement que la vasopressine puisse dans ce modèle favoriser une apparition plus précoce de l'hypertension artérielle. Cependant, chez l'homme obèse, la copeptine n'est pas associée avec l'élévation de la pression artérielle (Enhörning S. et al, 2013 ; Asferg C.L. et al, 2014).

### **3. Effets chroniques de la vasopressine et de l'activation des récepteurs V1a sur le métabolisme glucidique chez les rats Lean**

#### Glycémie et insulínémie à jeun :

Le traitement chronique par la vasopressine a entraîné une augmentation de la glycémie et de l'insulínémie à jeun au cours du temps chez les rats Lean (effet temps,  $p < 0,03$ ) (**Figure 9**). Après 4 semaines de traitement, les valeurs de glycémie et d'insulínémie et donc de l'HOMA-IR sont respectivement 1,3, 17 et 22 fois plus élevées que celles du groupe contrôle, ce qui suggère que chez les rats Zucker Lean, la vasopressine conduit à une résistance à l'insuline. Ces effets sont totalement inhibés par le co-traitement avec l'antagoniste V1a. La baisse de vasopressinémie endogène induite par le régime hydraté n'a pas induit de modification de la glycémie et de l'insulínémie à jeun.



**Figure 9 : Effets de la vasopressine et de l'antagoniste V1a sur les paramètres glucidiques à jeun chez les rats Zucker Lean**

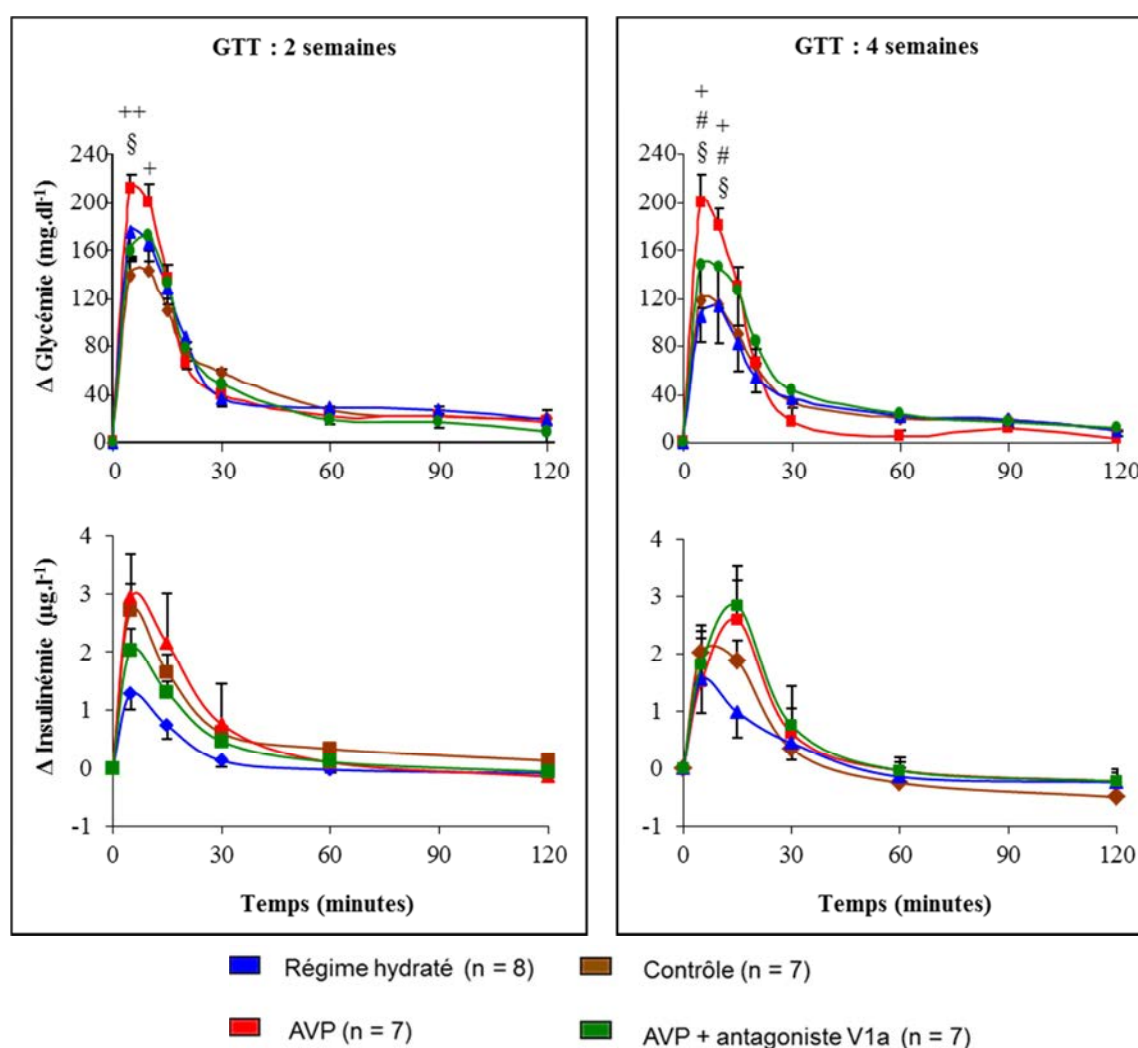
Evaluation de la glycémie, de l'insulinémie et de degré d'insulino-résistance chez les rats Zucker Lean après 6 heures de jeun. Anova à un facteur (traitement) avec mesures répétées : effet traitement,  $p < 0,002$  ; effet temps,  $p < 0,03$  ; interaction,  $p < 0,0001$ . AVP vs. Contrôle : +,  $p < 0,01$  ; ++,  $p < 0,001$  ; +++,  $p < 0,0001$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,01$  ; ##,  $p < 0,001$  ; ###,  $p < 0,0001$  ; AVP vs. Antagoniste V1a : §,  $p < 0,01$  ; §§,  $p < 0,001$  ; §§§,  $p < 0,0001$  ; Antagoniste V1a vs. Contrôle : ♦,  $p < 0,05$  ; Antagoniste V1a vs. Régime hydraté : ■,  $p < 0,03$  ; Avant traitement vs. 4 sem. : a,  $p < 0,004$  ; 2 sem. Vs 4 sem. : b,  $p < 0,007$ .

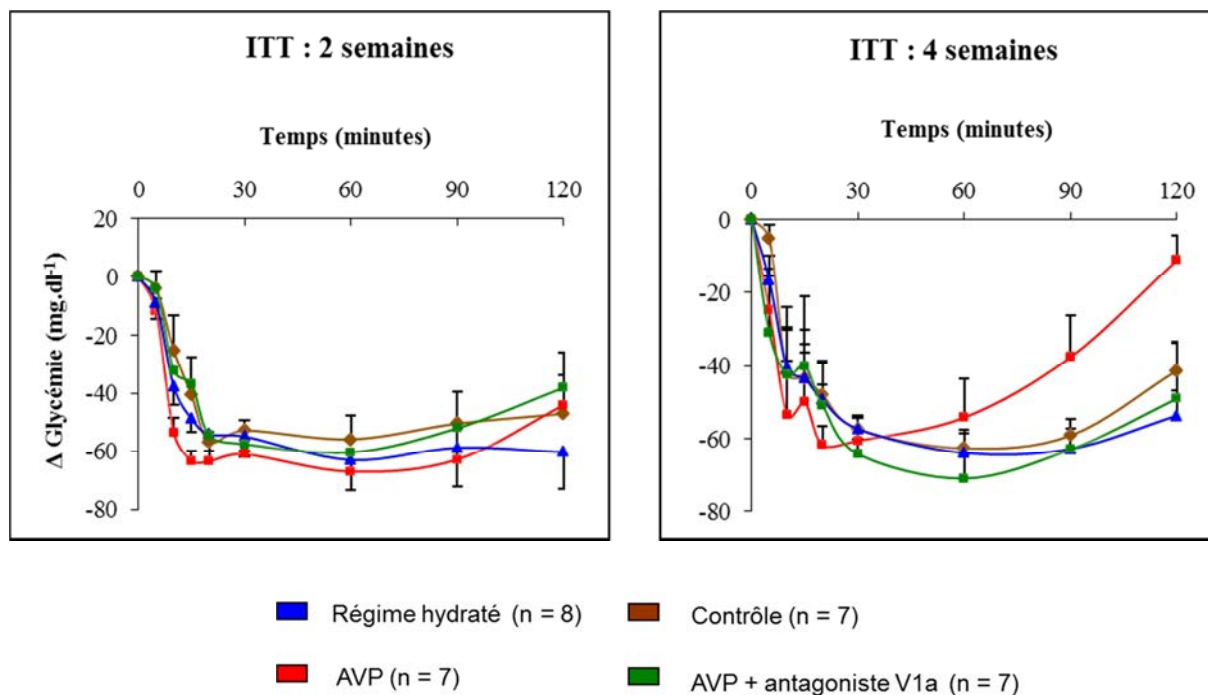
### Tests de tolérance au glucose et à l'insuline :

Afin de déterminer plus finement si le traitement par la vasopressine conduisait à une insulino-résistance, j'ai réalisé des tests de tolérance au glucose et à l'insuline (**Figure 10**).

Les rats traités avec la vasopressine ont présenté une réponse hyperglycémique augmentée durant les 10 premières minutes au cours du GTT sans modification de la réponse hyperinsulinémique comparées aux réponses des rats contrôles suggérant des anomalies de sécrétion et/ou de réponse à l'insuline. Le retour plus rapide de la glycémie à des valeurs normales après injection d'insuline suggère le développement d'une résistance à l'insuline induite par la vasopressine. L'antagoniste V1a inhibe totalement cet effet.

Comme les rats Sprague-Dawley, les rats Zucker Lean sous régime hydraté ont une réponse hyperinsulinémique qui tend à être moindre que celle des autres groupes suggérant une amélioration de la sensibilité à l'insuline ce qui n'a malheureusement pas été confirmé lors du test de tolérance à l'insuline. Nous ne pouvons exclure qu'une dose plus faible d'insuline au cours de l'ITT aurait pu permettre de mettre en évidence des différences au niveau des valeurs minimales de glycémie atteintes.





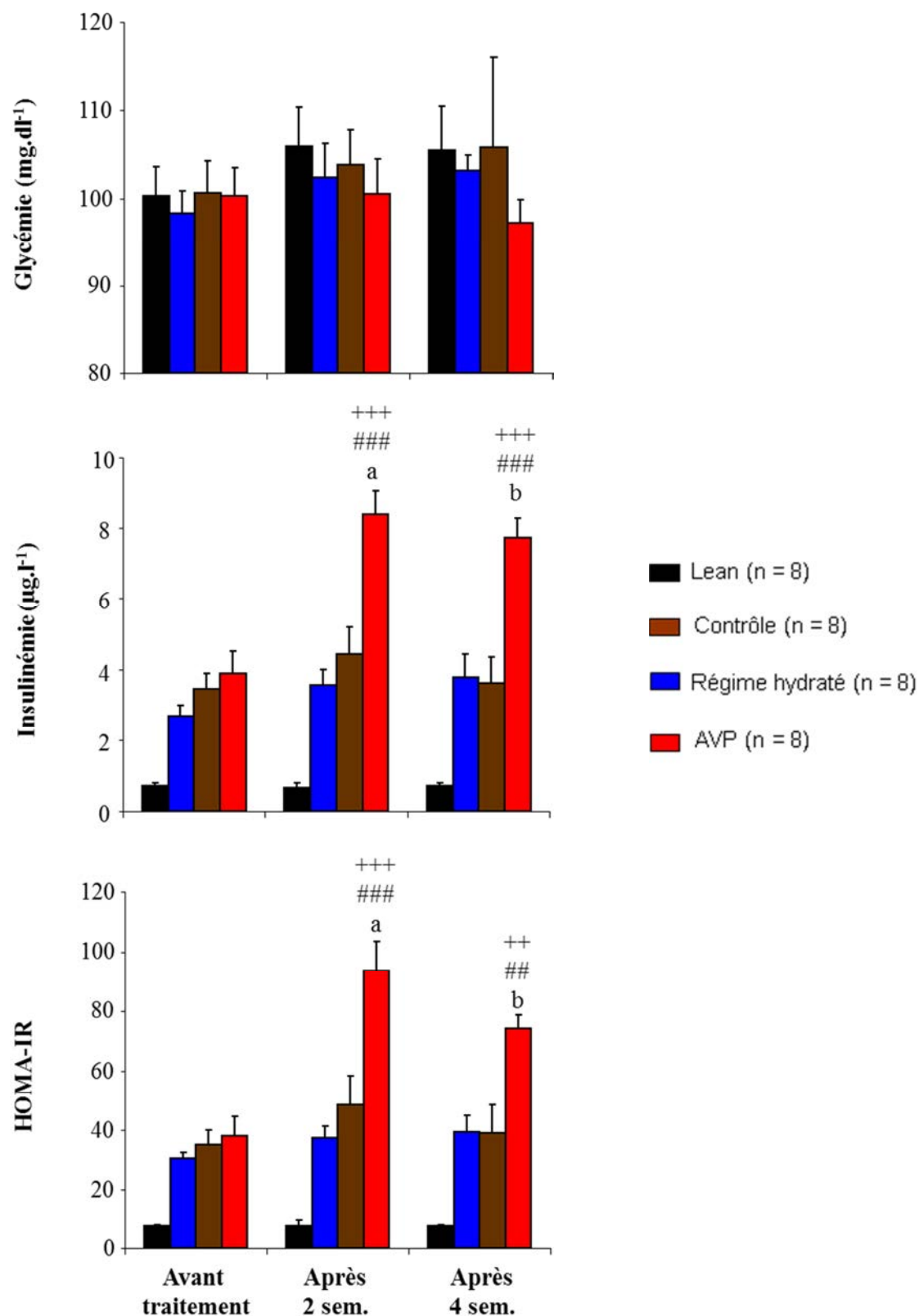
**Figure 10 : Conséquences des différents traitements sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez les rats Zucker Lean**

Après 2 semaines et 4 semaines de traitement, les rats à jeun depuis 6h sont soumis à un test de tolérance au glucose (GTT :  $1,5 \text{ g.kg}^{-1}$ , *i.p.*) ou à l'insuline (ITT :  $1 \text{ U.kg}^{-1}$ , *i.p.*). La réponse insulinémique a été déterminée au cours du GTT par une méthode Elisa. Anova à un facteur suivie par un test de Fisher *post Hoc* : AVP vs. Contrôle : +,  $p < 0,05$  ; ++,  $p < 0,005$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,05$  ; AVP vs. Antagoniste V1a : §,  $p < 0,01$ .

#### **4. Effets chroniques de la vasopressine sur le métabolisme glucidique chez les rats Zucker Obèses**

##### **Glycémie et insulinémie à jeun :**

Le traitement chronique avec la vasopressine n'a pas induit de modification de la glycémie à jeun mais a induit une augmentation significative de l'hyperinsulinémie et de l'HOMA-IR. La baisse de concentration plasmatique de vasopressine, apportée par une élévation de la prise hydrique, n'a pas eu de conséquence sur ces paramètres (**Figure 11**).



**Figure 11 : Effets de la vasopressine sur les paramètres glucidiques à jeun chez les rats Zucker Obèses**

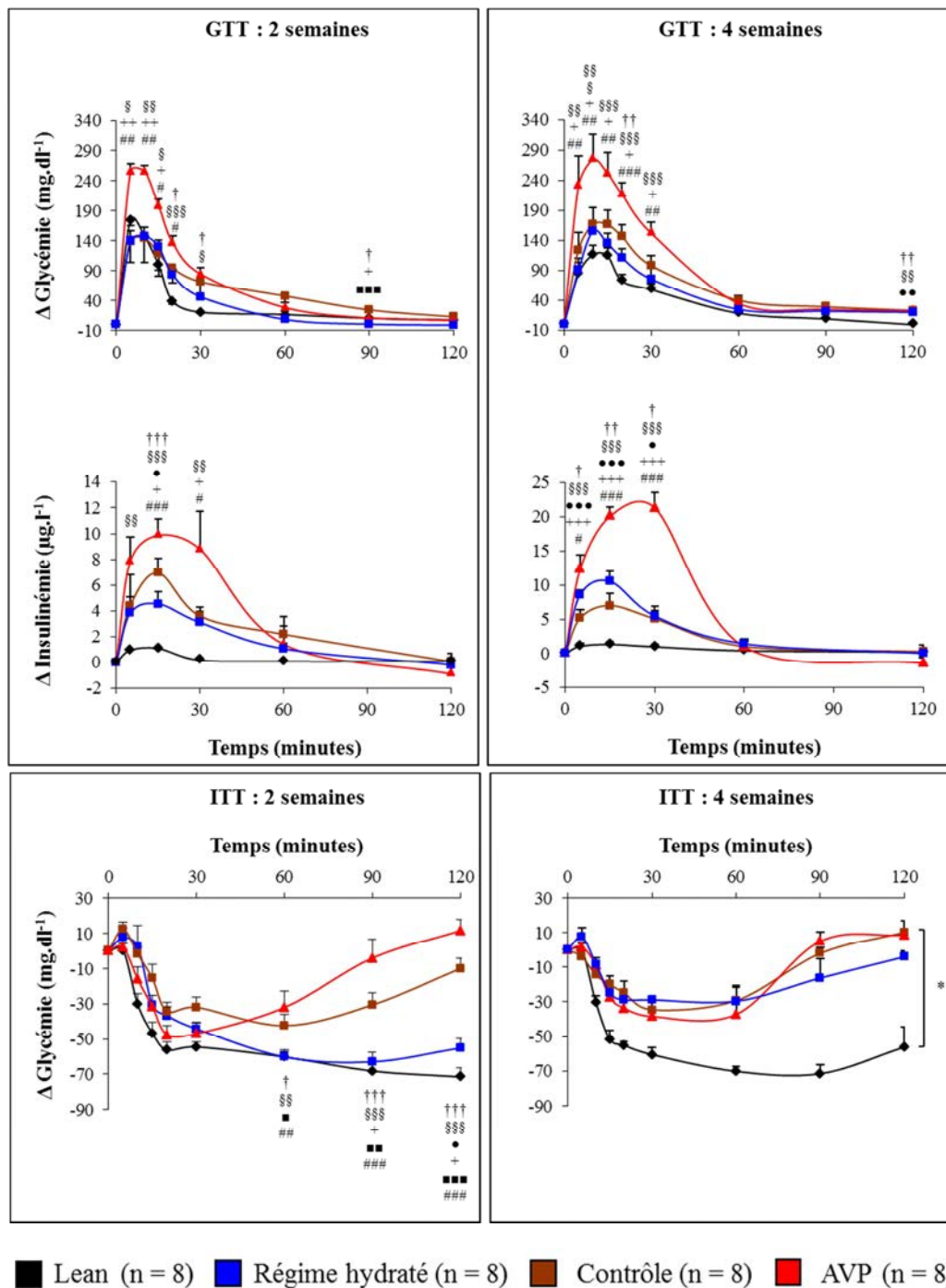
Evaluation de la glycémie, de l'insulinémie et de degré d'insulino-résistance chez les rats Zucker obèses après 6 heures de jeun. Anova à un facteur (traitement) avec mesures répétées : effet traitement,  $p < 0,0001$  ; interaction,  $p < 0,001$ . AVP vs. Contrôle : ++,  $p < 0,001$  ; +++,  $p < 0,0001$  ; AVP vs. Régime hydraté : ##,  $p < 0,001$  ; ###,  $p < 0,0001$  ; Avant traitement vs. 2 sem. : a,  $p < 0,0001$  ; Avant traitement vs. 4 sem. : b,  $p < 0,001$ .



### Tests de tolérance au glucose et à l'insuline :

Tout comme l'expérience réalisée chez les rats Zucker Lean, le traitement chronique avec la vasopressine a induit, au cours du test de tolérance au glucose, une réponse glycémique nettement supérieure à celle des autres groupes de rats. Cette hyperglycémie provoquée est également accompagnée par une augmentation dans l'amplitude et la durée de la réponse insulinémique chez les rats traités par l'AVP, effets particulièrement marqués après 4 semaines de traitement. En revanche, le régime hydraté n'a pas modifié les réponses glycémiques et insulinémiques comparées aux rats obèses contrôle. L'ensemble des résultats obtenus au cours du GTT conforte les données de l'HOMA-IR, à savoir une aggravation de la résistance à l'insuline par la vasopressine chez les rats Zucker obèses. Aussi, j'ai réalisé un test de tolérance à l'insuline dans le but de confirmer le phénotype.

Les résultats obtenus à 2 semaines (soit 10 semaines d'âge) ont montré, comme dans l'Etude 3 avec les rats Lean, que les différents niveaux de vasopressine n'induisent pas de différence dans la valeur maximale d'hypoglycémie mais induisent des différences significatives dans la vitesse de retour à la glycémie basale, celle-ci étant d'autant plus rapide que le niveau de vasopressine est élevé. Il est intéressant de noter que l'hyperhydratation permet de normaliser la réponse des rats obèses par rapport à celle des rats Lean laissant suspecter une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans ce groupe. Cependant, les effets obtenus au cours des ITT après 2 semaines de traitement sont perdus après 4 semaines de traitement (**Figure 12**).

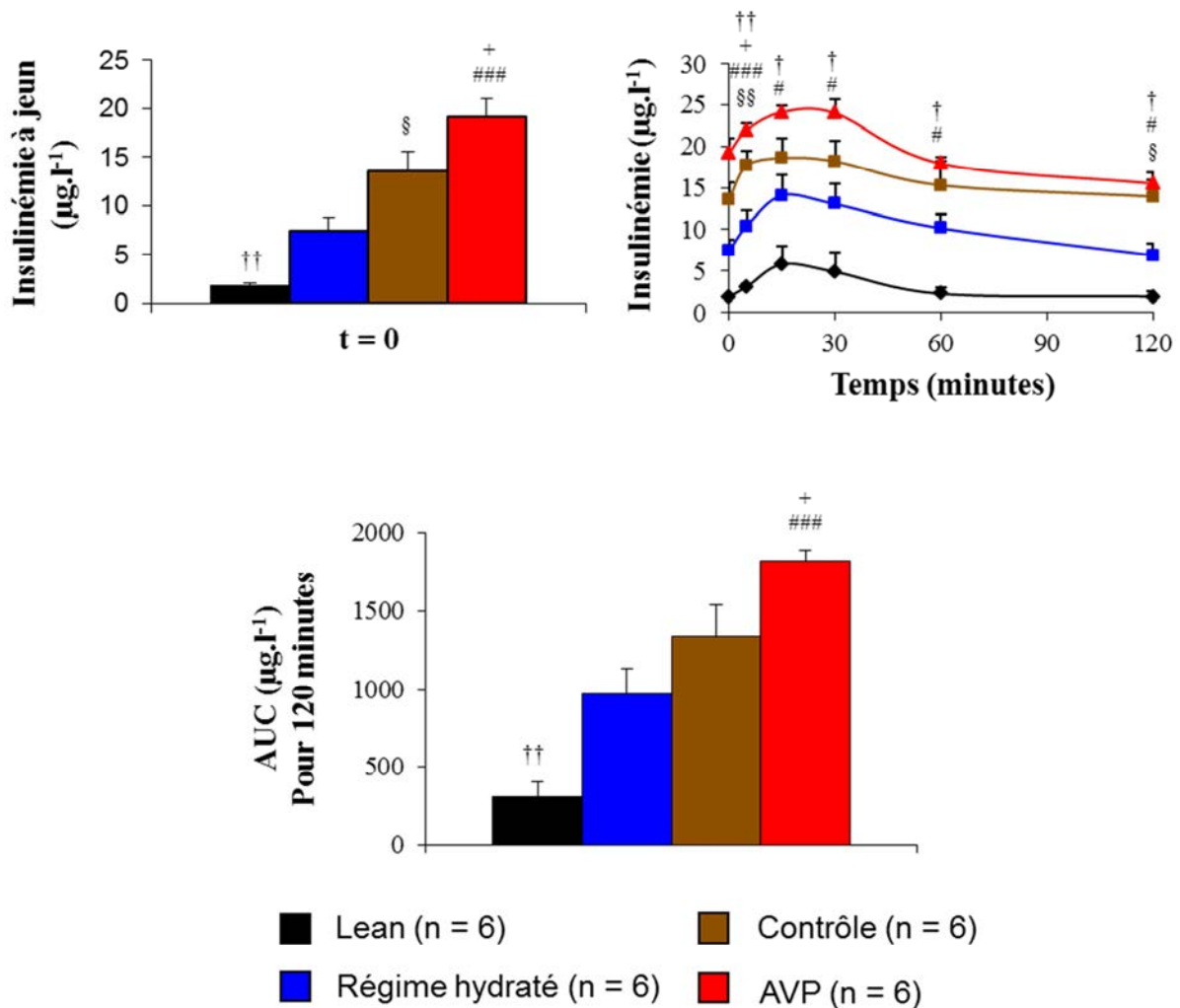


**Figure 12 : Conséquences des différents traitements sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez les rats Zucker obèses**

Après 2 semaines et 4 semaines de traitement, les rats à jeun depuis 6h sont soumis à un test de tolérance au glucose (GTT : 1,5 g.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*) ou à l'insuline (ITT : 1 U.kg<sup>-1</sup>, *i.p.*). La réponse insulinémique a été déterminée au cours du GTT par une méthode Elisa. Anova par mesures répétées : effet traitement,  $p < 0,02$  ; effet temps,  $p < 0,0001$  ; interaction,  $p < 0,0001$ . Anova à un facteur (traitement) suivie par un test de Fisher *post Hoc* : AVP vs. Contrôle : +,  $p < 0,01$  ; ++,  $p < 0,001$  ; +++,  $p < 0,0001$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,01$  ; ##,  $p < 0,001$  ; ###,  $p < 0,0001$  ; AVP vs. Lean : §,  $p < 0,01$  ; §§,  $p < 0,001$  ; §§§,  $p < 0,0001$  ; Contrôle vs. Régime hydraté : ■■■,  $p < 0,0001$  ; Lean vs. Régime hydraté, ●●●  $p < 0,0001$  ; Lean vs. Contrôle, †  $p < 0,01$ .

Ne comprenant pas pourquoi les effets étaient perdus et suspectant un défaut expérimental éventuel, j'ai prolongé cette expérience jusqu'à 10 semaines de traitements en suivant le même protocole. Cependant aucune différence n'a été retrouvée entre les groupes de rats Zucker obèses après 8 et 10 semaines de traitements au cours des tests de tolérance au glucose ou à l'insuline. Ces résultats suggèrent que dans ce modèle de syndrome métabolique, la vasopressine n'intervient que dans la phase précoce du développement des anomalies du métabolisme glucidique et qu'ultérieurement d'autres facteurs deviennent prépondérants. Des travaux chez le Zucker obèse, ont montré que la désensibilisation à l'insuline est progressive touchant d'abord les muscles squelettiques puis ensuite le tissu adipeux blanc et les autres tissus périphériques (Penicaud L. et al, 1987 ; Argilés J.M., 1989).

Toutefois, nous avons souhaité comprendre pourquoi la vasopressine influait sur la vitesse de retour à une glycémie normale après 2 ou 4 semaines de traitement chez les rats obèses ou les rats Lean respectivement mais pas sur l'amplitude maximale de la chute de la glycémie. L'analyse de données nous a permis de constater que malgré une dose d'insuline injectée identique dans tous les groupes de rats obèses, la concentration d'insuline atteinte chez les rats traités par la vasopressine est plus haute compte tenu de leur insulinémie de base à jeun plus haute (**Figure 13**). Par conséquent, les rats AVP ont présenté une réponse hypoglycémique relativement amoindrie que l'on considère le nadir ou l'aire sous la courbe globale par rapport aux rats contrôles. Cette apparente résistance à l'insuline est en accord avec le calcul de l'HOMA-IR et la réponse au GTT.



**Figure 13 : Réponse insulinémique au cours du test de tolérance à l'insuline chez les rats Zucker obèses**

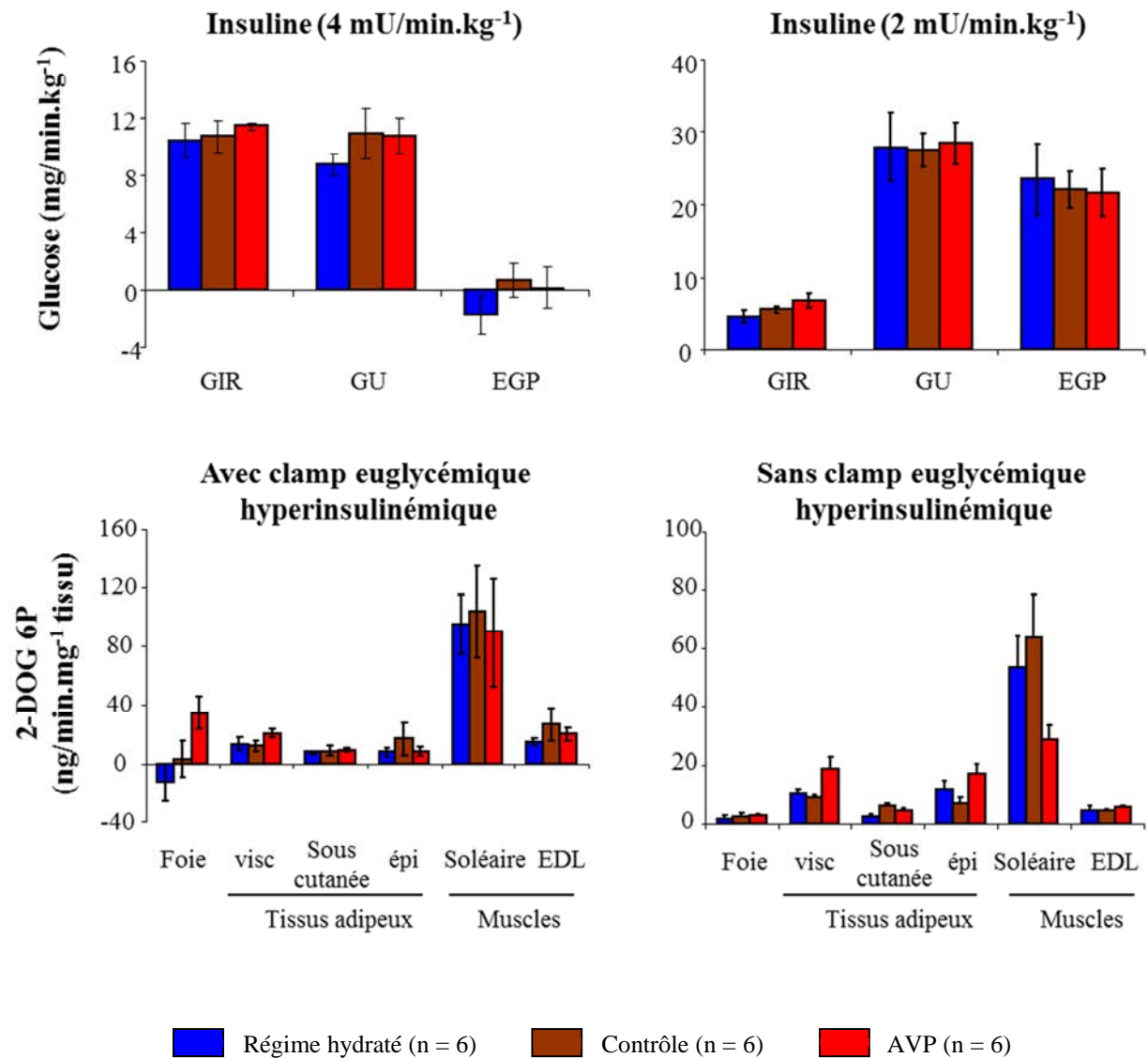
A) Insulinémie basale à jeun, avant l'injection d'insuline en intrapéritonéale ( $1 \text{ U.kg}^{-1}$ ). B) Réponse insulinémique au cours du test de tolérance à l'insuline. C) Aire sous la courbe. Anova par mesure répétée : effet traitement,  $p < 0,0001$  ; effet temps,  $p < 0,0001$  ; interaction,  $p = \text{ns}$ . Anova à un facteur (effet traitement) suivie par un test de Fisher *post hoc* : AVP vs. Contrôle : +,  $p = 0,02$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,01$  ; ###,  $p < 0,0001$  ; Contrôle vs. Régime hydraté : §,  $p < 0,01$  ; §§,  $p < 0,001$  ; Lean vs. autres groupes : †,  $p < 0,01$  ; ††  $p < 0,001$ .

### Clamp Euglycémique Hyperinsulinémique :

Afin de quantifier l'insulino-résistance suspectée par les résultats des GTT et ITT, nous avons utilisé la méthode de référence qu'est le clamp euglycémique hyperinsulinémique (**Figure 14**). Deux séries de clamps ont été réalisées sur des rats obèses traités pendant 2 semaines. Les données plasmatiques à jeun ainsi que les tests de tolérance au glucose et à l'insuline sans omettre la réponse insulinémique au cours du GTT ont montré les mêmes effets des différents traitements que dans l'expérience précédente (**Annexe 7**). Par conséquent, il semble confirmé que la vasopressine joue un rôle dans l'apparition des troubles du métabolisme glucidique.

Dans la première série, le clamp a été effectué avec une perfusion continue de  $4 \text{ mU/min.kg}^{-1}$  d'insuline. Nous avons pu maintenir une glycémie relativement stable dans tous les groupes de rats mais le GIR n'est pas devenu stable durant les deux heures de l'expérience pour les rats obèses contrôle ou sous vasopressine. De plus, nous n'avons pas obtenu de différence pour le GIR et le GU entre les groupes. L'une des explications a été que la dose d'insuline administrée était trop forte pour avoir un effet visible sur ces deux paramètres. Nous avons alors recommencé l'expérience sur une autre série de rats en appliquant une perfusion d'insuline à une dose deux fois plus faible ( $2 \text{ mU/min.kg}^{-1}$ ). Les résultats ont montré un GIR deux fois plus faible qu'avec la dose précédente. Ceci est cohérent car si on perfuse deux fois moins d'insuline alors il est besoin de perfuser deux fois moins de glucose pour compenser l'hypoglycémie. En revanche, nous n'avons pas éteint l'EGP mais ceci peut s'expliquer par une production hépatique intervenant également dans la compensation de l'hypoglycémie. Le GU aurait dû diminuer or dans notre cas, le GU a augmenté par rapport à l'expérience précédente avec  $4 \text{ mU/min.kg}^{-1}$  pour des raisons non-déterminées. Comme précédemment, nous n'avons obtenu aucune différence entre les groupes.

Les deux expériences de clamp euglycémique hyperinsulinémique ne nous ayant pas permis de clarifier l'effet de la vasopressine sur l'insulino-résistance, nous avons entrepris de mesurer directement le niveau de captation de glucose dans les tissus cibles (foie, tissu adipeux et muscles) par le test du 2-Deoxy-D-Glucose (**Figure 14**)



**Figure 14 : Clamps Euglycémique Hyperinsulinémique chez les rats Zucker obèses**

Après 2 semaines, les rats à jeun depuis 6h sont soumis à un Clamps Euglycémique Hyperinsulinémique (voir matériel et méthodes). Visc : tissu adipeux viscéral ; épi : tissu adipeux épидидymaire. Les résultats n'ont montré aucune différence entre les groupes de rat.

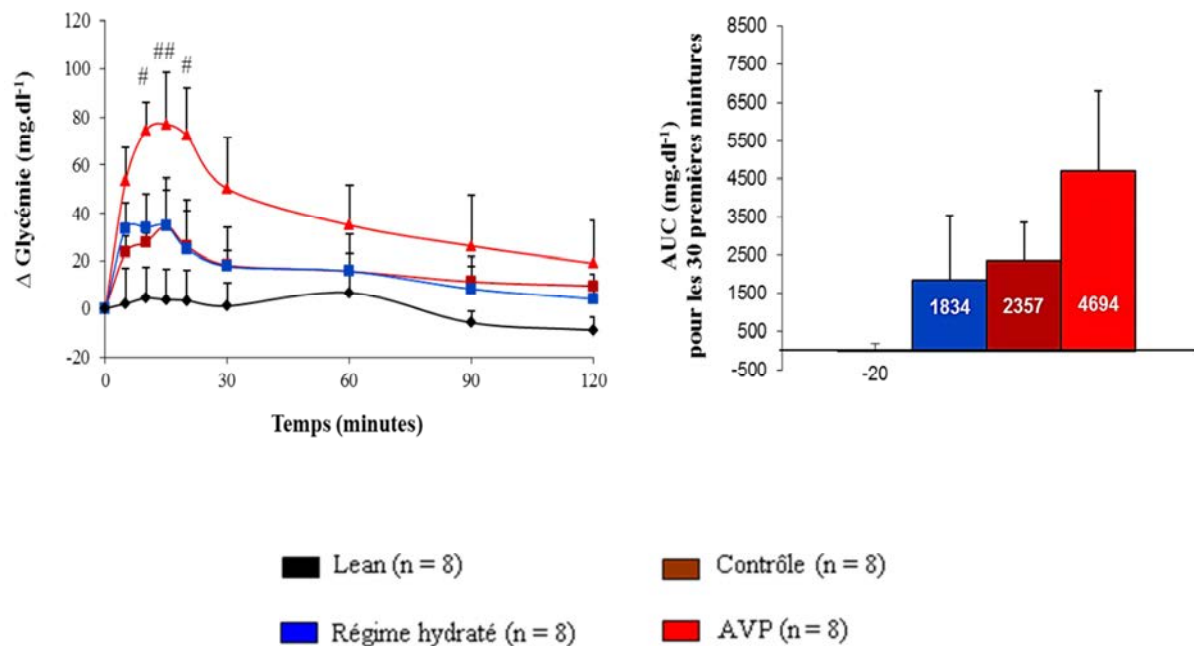
#### Test au 2-Deoxy-D-Glucose :

Le test du 2-Deoxy-D-Glucose (2-DOG) a été effectué après 2 semaines de traitement. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 14**. Aucune différence significative n'apparaît entre les différents groupes quant à la captation de glucose par les organes ou la pente de décroissance plasmatique du 2-DOG. Compte tenu que le traitement par l'AVP a induit une augmentation de l'insulinémie, ces résultats bien qu'apparemment négatifs vont dans le sens d'une augmentation de l'insulino-résistance chez les rats traités par AVP. En effet malgré une insulinémie plus élevée, ceux-ci n'ont pas de captation de glucose plus importante.

Peu de travaux dans la littérature se sont intéressés au rôle de la vasopressine et de ses récepteurs dans la captation du glucose. Au niveau du tissu adipeux, le glucose rentrant dans l'adipocyte est transformé en pyruvate pour former des acides gras puis des triglycérides. Il a été décrit que la vasopressine jouait un rôle antilipolytique chez le rat et l'homme (Rofe A.M. et Williamson H.D., 1983) et que cet effet passait par l'intermédiaire des récepteurs V1a présent à la surface des adipocytes (Hiroyama M. et al, 2007). Certains travaux ont mis en évidence la présence des récepteurs V1a au niveau des muscles squelettiques (Thibonnier M. et al, 1996 ; Alvisi M. et al, 2008) mais ceux-ci semblent impliqués dans la différenciation des cellules musculaires et non dans le métabolisme du glucose.

#### Test au pyruvate :

La capacité de production hépatique de glucose a été testée après deux semaines de traitement en évaluant la réponse hyperglycémique au cours d'une charge en pyruvate. Les résultats obtenus lors de l'injection d'une charge de pyruvate, présentés dans la **figure 15** montrent que les rats obèses traités par l'AVP ont une réponse hyperglycémique augmentée par rapport aux rats obèses contrôles, tant au niveau de la valeur maximale atteinte qu'au niveau de la durée de la réponse résultant en des valeurs deux fois plus hautes d'aire sous la courbe. Ainsi dans les conditions de jeûne, la vasopressine favorise la néoglucogénèse hépatique.



**Figure 15 : Effets des différents traitements sur la production endogène de glucose à partir du pyruvate chez les rats Zucker obèses**

Après 2 semaines de traitement, sur une nouvelle série de rats Zucker obèses, les rats ont été soumis à un test de tolérance au pyruvate après 6 heures de jeun. Anova à un facteur suivie par un test de Fisher post hoc :

AVP vs. autres groupes, #,  $p < 0,05$  ; ##,  $p < 0,01$ .

## **5. Mécanismes impliqués dans les effets de la vasopressine sur le métabolisme glucidique hépatique**

Les tests décrits ci-dessus ayant montré une perturbation du métabolisme glucidique hépatique induit par la vasopressine, nous avons tenté d'en éclaircir les mécanismes.

### **➤ Transporteurs de glucose et enzymes clés des voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique (Tableaux 8 et 9)**

Au niveau du foie, la quantification de l'ARNm des gènes codant pour les transporteurs de glucose GLUT2 et GLUT1 n'a pas mis en évidence de différence d'expression dans les différents groupes étudiés. L'analyse du niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes clé des voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique montre que le traitement chronique par la vasopressine a induit une augmentation dans l'expression des



gènes de la glucose 6-phosphatase et de la glycogène phosphorylase chez les rats Lean et que cet effet est aboli par l'administration concomitante d'un antagoniste V1a. Ces résultats confirment les observations faites précédemment chez les rats Sprague-Dawley et sont en faveur d'une augmentation de la production de glucose hépatique par l'activation de la glycogénolyse. Cet effet transcriptionnel de la vasopressine n'est pas observé chez les rats obèses. Par ailleurs, bien que les résultats du test au pyruvate chez les rats obèses démontrent une augmentation de la capacité néoglucogénique du foie sous l'influence de la vasopressine, l'expression du gène de la PEPCK n'est pas non plus augmentée. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- 1) Les effets transcriptionnels de la vasopressine sont mineurs, les modifications du métabolisme du glucose résultent davantage de modifications post-traductionnelles en particulier chez le rat obèse (acétylation, glycosylation). Une mesure de l'activité enzymatique directe, sur des échantillons hépatiques, aurait permis de mieux caractériser les effets métaboliques de la vasopressine sur la production de glucose.
- 2) La stimulation de la néoglucogénèse hépatique par la vasopressine peut impliquer la voie de la PEPCK, la voie des pentoses phosphates permettant de produire du glucose 6-phosphate à partir du fructose 6-phosphate mais également à partir de l'absorption du glycérol hépatique permettant la production des trioses phosphates (Hagopian K. et al, 2008).

**Tableau 8 : Niveau d'expression des enzymes clés intervenant dans les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse hépatique chez les rats Zucker lean**

	Régime hydraté (n = 7)	Contrôle (n = 6)	AVP (n = 5)	AVP + antagoniste V1a (n = 7)
<b>PEPCK</b>	1,19 ± 0,08	1,00 ± 0,15	0,81 ± 0,05 #	1,05 ± 0,24
<b>G6Pase</b>	1,27 ± 0,12	1,00 ± 0,13	1,77 ± 0,41 + §	1,03 ± 0,05
<b>GPase</b>	1,13 ± 0,18	1,00 ± 0,08	1,84 ± 0,34 + # §	1,27 ± 0,06 ♦
<b>V1aR</b>	1,21 ± 0,11	1,00 ± 0,16	1,78 ± 0,24 + #	1,65 ± 0,31 ♦

Anova par mesures répétées : effet traitement,  $p < 0,002$  ; effet temps,  $p < 0,04$  ; interaction,  $p < 0,0001$

Anova à un facteur (test-t) suivi par un test de Fisher *post Hoc* :

AVP vs. Contrôle : +,  $p < 0,03$

AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,04$

AVP vs. Antagoniste V1a : §,  $p < 0,05$

V1a vs. Contrôle : ♦,  $p < 0,05$

**Tableau 9 : Expression des gènes des enzymes clés impliquées dans la production hépatique de glucose chez les rats Zucker Obèses.**

	Lean (n = 6)	Régime hydraté (n = 5)	Contrôle (n = 6)	Vasopressine (n = 5)
PEPCK	2,00 ± 0,20*	1,39 ± 0,20	1,00 ± 0,37	0,99 ± 0,10
G6Pase	1,17 ± 0,10	0,96 ± 0,13	1,00 ± 0,08	1,10 ± 0,15
Glycogen Phosphorylase	0,97 ± 0,10	0,92 ± 0,23	1,00 ± 0,21	0,95 ± 0,17
GLUT2	1,43 ± 0,16	1,17 ± 0,28	1,00 ± 0,15	1,14 ± 0,16
GLUT1	0,84 ± 0,20	0,90 ± 0,31	1,00 ± 0,13	0,95 ± 0,27
V1aR	1,01 ± 0,03#+	0,73 ± 0,13	1,00 ± 0,17	1,52 ± 0,15††

ANOVA à un facteur suivie par un test de Fisher *post hoc* :

Lean vs Contrôle, \* p=0,01 ; Lean vs. Régime hydraté, # p=0,04 ; Lean vs. AVP, + p<0,01 ;

AVP vs. Régime hydraté, †† p<0,001

### ➤ Implication des récepteurs V1a hépatiques

Les récepteurs V1a étant impliqués dans les effets de la vasopressine sur le métabolisme du glucose, nous avons examiné si leur expression était modifiée chez les rats obèses par rapport aux rats Lean et si un taux élevé de vasopressine modifiait leur niveau d'expression. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9**.

Les études sur la régulation des récepteurs de la vasopressine concernent essentiellement leurs caractéristiques de désensibilisation (voir introduction) mais relativement peu de travaux se sont intéressés à la régulation transcriptionnelle. Seul la régulation transcriptionnelle et traduction, bien que pas évidente, du récepteur V1b a été décrite (Aguilera G. et Rabadan-Diehl C., 2000). Dans nos études expérimentales, le niveau d'expression du gène codant pour le récepteur V1a est similaire chez les rats Lean et les rats obèses. Ce résultat diffère de celui d'Assimakopoulos-Jeannet F. et ses collaborateurs (1983) et de Cantau B. et ses collaborateurs (1984) qui suggéraient une diminution du nombre des récepteurs V1a hépatiques (sur la base d'une absence de liaison de la vasopressine à son récepteur) chez les souris ob/ob et db/db contrairement aux souris Lean. Cependant, Cantau B. et ses collaborateurs n'ont pas observé cette diminution chez des rats Zucker fa/fa. Par ailleurs,

nous observons que l'abondance des ARNm codant pour le récepteur V1a est augmenté chez les rats traités par la vasopressine et diminué chez les rats avec le régime hydraté ce qui suggère que la vasopressine est capable d'induire l'expression du récepteur V1a au niveau du foie. L'absence d'effet de l'antagoniste V1a sur l'expression des récepteurs chez les rats Lean (**Tableau 8**) est en accord avec les expériences de Serrière V. et ses collaborateurs qui montrent que l'expression des ARNm des récepteurs V1a n'est pas modifiée en présence de l'antagoniste (Serrière V. et al, 2001).

Actuellement, la cascade de signalisation entre l'activation des récepteurs V1a (production cytosolique de calcium) et la production hépatique de glucose n'est pas connue. Toutefois, la voie de la glycogénolyse fait intervenir, avant la glycogène phosphorylase, la phosphorylase kinase qui nécessite du calcium pour être activée (Bollen M. et al, 1998). De plus, l'activation du récepteur V1a active également la Protéine Kinase C (PKC) intervenant dans la phosphorylation de différentes protéines. La PKC peut induire la phosphorylation du récepteur à l'insuline empêchant son activation par l'hormone (Tanti J.F. et al, 1994 ; Griffin M.E. et al, 1999 ; Idris I. et al, 2001 ; Yu C. et al, 2002). La PKC a également été montrée comme principal facteur intervenant dans l'inactivation de la glycogène synthase sur des hépatocytes isolés de rats Zucker (Van de Werve G. et Massillon D., 1990).

#### ➤ **Autres effets de la vasopressine sur le foie**

En outre, d'autres effets de la vasopressine sur le métabolisme du glycogène pourraient contribuer à l'intolérance au glucose. Bien que n'ayant pas d'effet détectable sur la pression artérielle systémique, nous ne pouvons exclure que la vasopressine en diminuant le débit sanguin hépatique par ses effets vasoconstricteurs pourrait favoriser l'hypoxie et entraîner ainsi une augmentation de la glycogénolyse (Hems D.A. et al, 1975). Par ailleurs, bien que l'osmolalité plasmatique ne soit pas significativement différente entre les groupes, nous ne pouvons pas exclure qu'une altération légère de l'osmolarité ambiante de tissus cibles de l'insuline puisse être un facteur supplémentaire contribuant à une intolérance au glucose. Il a été montré que la diminution de volume (shrinkage) des hépatocytes liée à l'hyperosmolarité du milieu extracellulaire inhibe la synthèse des protéines et la synthèse de glycogène (Lang F. et al, 1998).

### ➤ Vasopressine et résistance à l'insuline, voies de signalisation

Au cours des expériences précédentes décrites ci-dessus, nous avons montré que le traitement chronique par la vasopressine conduisait à une intolérance au glucose. L'intolérance au glucose correspond à une réduction ou incapacité pour les organes cibles (foie, muscles et tissus adipeux) de stocker convenablement le glucose sanguin, en excès, afin de réduire la glycémie. Cependant, le stockage du glucose est principalement lié à l'action de l'insuline (hormone hypoglycémiante) sur ces organes cibles. En conséquence, les résultats laissaient suspecter une résistance à l'insuline.

Nous avons alors entrepris des expériences, en collaboration avec l'équipe de Mme Fougelle Fabienne, afin de déterminer comment cette hormone pouvait induire cet effet. Nous avons alors émis deux hypothèses principales : 1) action sur la voie de signalisation de l'insuline ou sur le récepteur à l'insuline et 2) augmentation du stress du réticulum endoplasmique hépatique.

#### Voies de signalisation de l'insuline dans le foie :

L'analyse par Western blot du niveau d'expression des formes phosphorylées de deux enzymes impliquées dans la signalisation insulinémique : la Protéine kinase B (PKB) et la Glycogène Synthase Kinase (GSK) n'a pas donné de résultat concluants. D'autres expériences sont envisagées (voir Perspectives).

#### Stress du réticulum endoplasmique dans le foie:

Il est connu que le stress du réticulum endoplasmique ou UPR (Unfolded Protein Response), lié à une accumulation de protéines mal repliées, conduit à une inhibition de la signalisation insulinémique et en conséquence à une insulino-résistance (Fougelle F et Ferré P, 2007). Les données, montrées dans le tableau 10, représentent l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique à savoir les facteurs de transcription dépendant de l'AMPc ATF4 et 6, la protéine homologue à C/EBP (CHOP) participant à la voie apoptotique quand la réponse UPR ne peut être reversée (Malhi H. et Kaufman R.J., 2011) et TRB3 (*tribbles-related protein 3*) qui intervient dans la voie CHOP/ATF4 et favorise l'insulino-résistance (Ohoka N. et al, 2005 ; Koh H-J. et al, 2013). L'analyse des RT-PCR n'a révélé aucune différence significative entre les groupes de rats (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Expression des gènes de facteurs de transcriptions et protéines du stress du réticulum endoplasmique**

	Lean (n = 6)	Régime hydraté (n = 5)	Contrôle (n = 6)	Vasopressine (n = 5)
ATF4	1,11 ± 0,41	0,91 ± 0,16	1,00 ± 0,32	0,90 ± 0,30
ATF6	0,84 ± 0,28	1,12 ± 0,15	1,00 ± 0,19	1,22 ± 0,24
CHOP	1,31 ± 0,47	1,08 ± 0,32	1,00 ± 0,13	0,93 ± 0,24
TRB3	1,71 ± 0,27	1,34 ± 0,26	1,00 ± 0,34	0,77 ± 0,25

Anova à un facteur (effet traitement) suivie par un test de Fisher post hoc : aucune significativité

### **Effets indirects de la vasopressine**

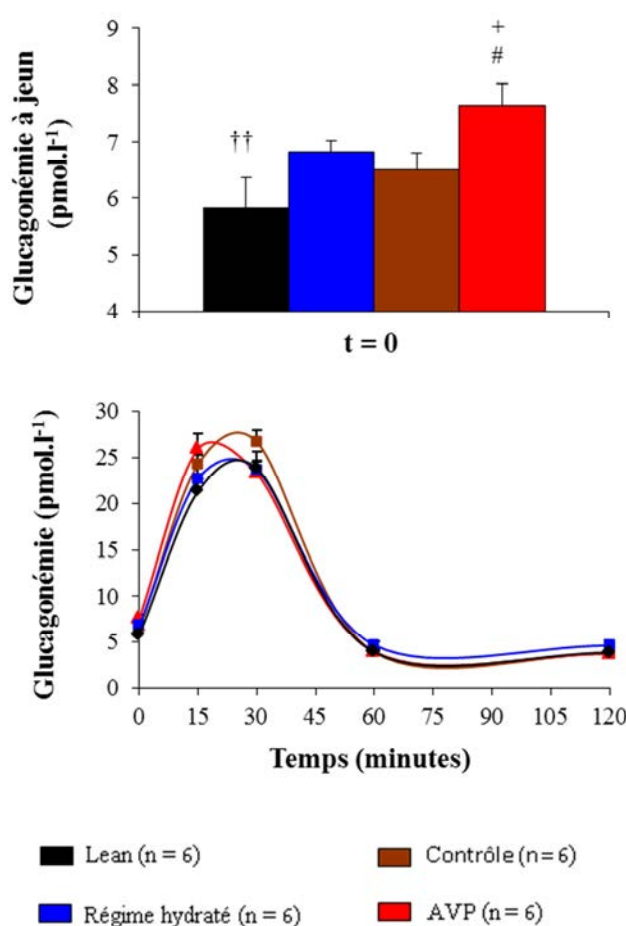
Comme déjà discuté, un grand nombre d'étude *in vitro* et *ex vivo* sur organes isolés ont montré que la vasopressine est capable d'induire directement la production de glucose en agissant sur le foie. Nos données obtenus, *in vivo*, ont également permis de démontrer que la vasopressine était capable d'agir sur la production de glucose. Toutefois, les résultats ne montrent pas s'il s'agit d'un effet direct de la vasopressine. Par conséquent, il est possible qu'elle puisse avoir aussi une action indirecte sur la production de glucose.

### **Glucagon :**

Outre l'insuline, le glucagon est une hormone importante dans l'homéostasie du glucose. Plusieurs travaux ont montré son implication dans la pathogenèse de l'hyperglycémie dans le diabète (Cryer P.E., 2012). La vasopressine pourrait augmenter la sécrétion de glucagon par le biais de l'activation des récepteurs V1b dans les îlots pancréatiques (Lee B. et al, 1995 ; Yibchok-Anun S. et al, 2000 ; Abu-Basha E.A. et al, 2002), ou indirectement en stimulant la sécrétion d'épinéphrine par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale (Guillon G. et al, 1998). Un « cross talk » entre le récepteur V1a et le récepteur du glucagon et leurs voies de signalisation a été également décrit dans les hépatocytes (Morgan N.G. et al, 1983 ; Aarab L. et al, 1999).

Les résultats de l'Etude 1, suggéraient que la vasopressine par ses récepteurs V1b participerait à la glucagonémie basale des rats Sprague-Dawley. Dans l'Etude 4 sur des rats obèses, nous

avons observé une glucagonémie à jeun légèrement supérieure chez les rats traités par la vasopressine par rapport aux rats contrôles ( $p < 0,04$ ) (**Figure 16**) mais cet effet n'a pas été retrouvé dans toutes les séries. Cependant, ce seul constat ne permet pas d'affirmer que la vasopressine stimule la production de glucose par une augmentation de la glucagonémie. Et effectivement, le dosage de la glucagonémie au cours de l'ITT, n'a fait apparaître aucune différence significative entre les groupes tant au niveau basal que pendant le test de tolérance à l'insuline. Une augmentation transitoire de la glucagonémie est observée uniquement pendant le pic d'hypoglycémie et avec une même amplitude dans tous les groupes de rats obèses et dans le groupe de rat Lean. A notre connaissance, aucun travail n'avait comparé à ce jour la réponse glucagonémique des rats Zucker obèse et des rats Lean.



**Figure 16 : Glucagonémie à jeun (A) et au cours du test de tolérance à l'insuline (B) des rats Zucker obèses après 2 semaines de traitement**

La glucagonémie a été mesurée par une méthode Elisa après 6 heures de jeun. Anova à un facteur (traitement) suivie par un test de Fisher *post Hoc* : AVP vs. Contrôle : +,  $p = 0,02$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,01$  ; Lean vs autres groupes : ††  $p < 0,001$

### Catécholamines :

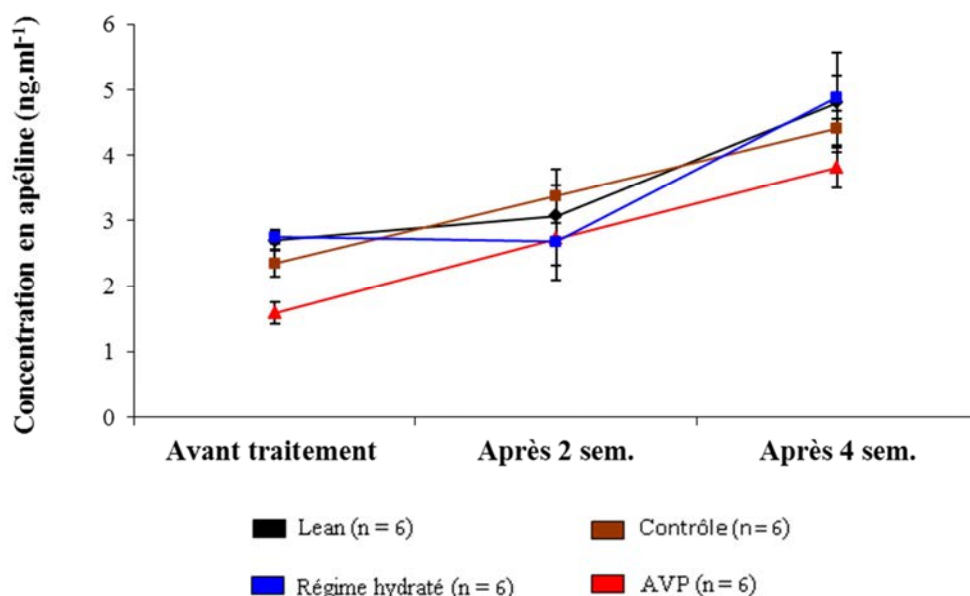
D'autres hormones sont capables d'induire la production hépatique de glucose, notamment les catécholamines produites par la médullo-surrénale (Lager I. et al, 1986). Au niveau de cet organe, il a été démontré la présence de tous les récepteurs à la vasopressine, y compris les récepteurs V2 (Birumachi J. et al, 2007 ; Gallo-Payet N. et Guillon G., 1998 ; Grazzini E. et al, 1996 ; Hernando F. et al, 2001). Il a également été démontré que la vasopressine était inductrice de la sécrétion des catécholamines par l'intermédiaire des récepteurs V1b présents uniquement dans les cellules chromaffines (Itoh S. et al, 2006 ; Armando I. et al, 1989). Nos conditions de recueils urinaires n'ont pas permis de faire des dosages d'adrénaline et de noradrénaline dans des conditions optimales. En effet les catécholamines urinaires, représentant seulement 3% des catécholamines circulantes, subissent très rapidement une oxydation spontanée les convertissant en noradénochrome et adrénochrome, si le milieu n'est pas acidifié. Les résultats de dosages urinaires de l'acide vanillyl-mandélique (VMA), un des produits de dégradation des catécholamines, montrent que leur excrétion n'est pas significativement différente entre les rats Lean traités par la vasopressine et les rats contrôles (**Tableau 6**). Par conséquent, il est peu probable que la vasopressine exogène induise une augmentation de la glycémie de manière indirecte via les récepteurs V1b sur la surrénale. Cependant, de façon inexplicable, l'excrétion de VMA est augmentée chez les rats avec une forte hydratation et donc un faible taux circulant de vasopressine. Ces résultats sont en cours de confirmation par le dosage de métanéphrine et normétanéphrine qui sont des métabolites intermédiaires entre les catécholamines et le VMA.

### Apéline :

La vasopressine est synthétisée et sécrétée par les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Dans cette même région cérébrale, il a été décrit la présence du récepteur à l'apéline (APJ) et l'apéline y est co-localisée avec la vasopressine (O'Carroll A.M. et al, 2003 ; De Mota N. et al, 2004). Au niveau du système nerveux central, il a pu être démontré une relation étroite entre la vasopressine et l'apéline. En effet, le taux de vasopressine est augmenté chez les souris KO-APJ alors que l'injection intra-cérébroventriculaire d'apéline conduit à une diminution de la sécrétion vasopressinergique (Reaux A. et al, 2001 ; Roberts E.M. et al, 2010). L'apéline et la vasopressine sont sécrétées en réponse à des changements opposés de l'osmolarité plasmatique aussi bien chez l'animal que chez l'homme. L'apeline exerce un effet modulateur négatif sur la sécrétion de la vasopressine et sur ses effets rénaux (Azizi M., 2008 ; Hus-Citharel A. et al, 2008 ; Galanth C. et al, 2012). Au niveau

périphérique, l'apéline est sécrétée par les adipocytes et elle est impliquée dans le métabolisme glucidique et lipidique. Il a été démontré que l'administration d'apéline améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline chez des souris génétiquement obèses ou rendues obèse par un régime riche en lipides. Les souris KO-APJ nourries avec un riche gras, présentent une intolérance au glucose et une insulino-résistance plus marquées que des souris sauvages (Yue P. et al, 2010). Les taux plasmatiques élevés en apéline observés dans des modèles d'obésité et de diabète de type 2 (Reaux-Le Goazigo A. et al, 2011) constituerait un mécanisme de défense contre la sévérité de ces pathologies. Les effets bénéfiques de l'apéline passeraient principalement par une amélioration de la captation de glucose dans les muscles squelettiques (Kawamata Y. et al, 2001 ; Dray C. et al, 2008 ; Yue P. et al, 2010). Cependant, ces effets protecteurs de l'apéline sont très controversés (Drougard A. et al, 2013 ; Knauf C. et al, 2013). Compte tenu de ces données de la littérature, il nous a semblé important de doser l'apéline.

Les résultats obtenus dans nos expériences ont mis en évidence une augmentation temps-dépendante ( $p < 0,03$ ) de la concentration apelinergique mais toutefois ils n'ont montré aucune différence significative quel que soit le traitement administré (**Figure 17**). Or la perfusion exogène de vasopressine, comme le régime hydraté, diminue la sécrétion endogène de VP. On aurait donc pu s'attendre à une augmentation de la production hypothalamique et de la concentration plasmatique de l'apéline.



**Figure 17 : Effet des différents traitements sur la concentration apelinergique chez les rats Zucker obèses**  
La concentration en apéline a été déterminée par une méthode Elisa, comme indiqué dans le matériel et méthode. Anova à un facteur (traitement) suivie par un test de Fisher *post Hoc* : aucune significativité.



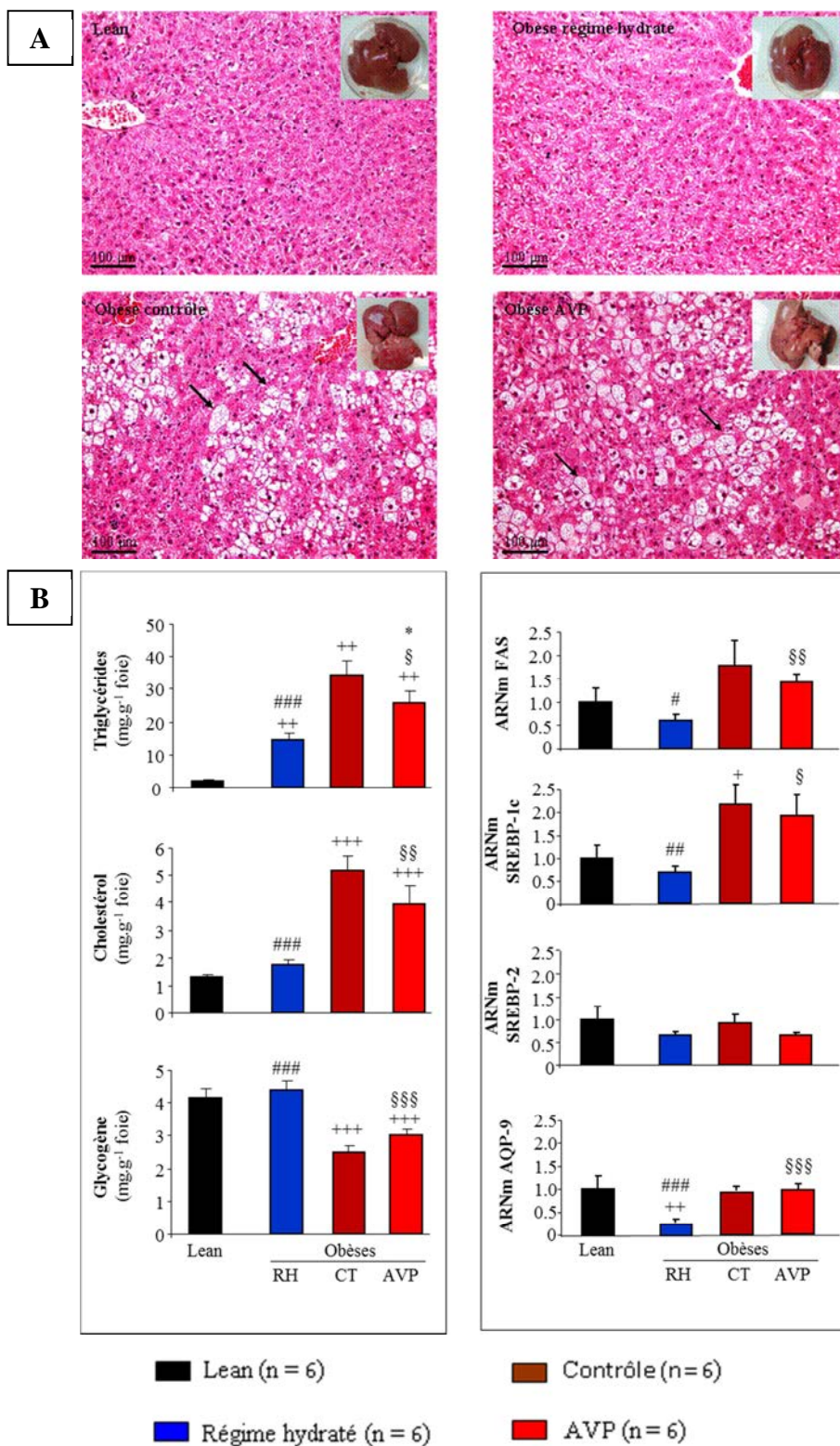
### Rôle du rein

Il est important de noter, même si la production de glucose se fait principalement au niveau du foie par la glycogénolyse, la néoglucogénèse ou encore suite à l'utilisation des acides gras provenant du tissu adipeux, la production de glucose entraînant une augmentation de la glycémie peut également survenir par une activation de la néoglucogénèse dans le rein. En effet, il a été démontré que la néoglucogénèse rénale était augmentée chez le rat diabétique (Joseph P.K. et Subrahmanyam K., 1968) à partir du lactate, de la glutamine et du glycérol avec principalement une augmentation de l'activité de la PEPCK (Eid A. et al, 2006).

### **6. Conséquence surprenante de l'hydratation sur la stéatose hépatique**

Le jour où j'ai sacrifié les rats Zucker obèses, j'ai observé une altération dans l'aspect des foies chez les rats contrôle ou traités avec la vasopressine par rapport aux foies des rats avec un apport hydrique augmenté ou par rapport aux Lean. Mes recherches sur les conséquences d'une altération hépatique dans l'obésité m'ont conduit à analyser la stéatose hépatique. Les résultats sont présentés sur la **figure 18**.

Le contenu hépatique en triglycérides est régulé par des activités moléculaires qui facilitent d'une part l'entrée des triglycérides, la synthèse d'acide gras et l'estérification, et d'autre part, l'oxydation des acides gras et la sortie des triglycérides. La stéatose hépatique s'installe lorsque les entrées sont supérieures aux sorties. En d'autres termes, elle se caractérise par une accumulation de lipides dans le foie. Les rats Zucker obèses sont un modèle génétique d'obésité suite à l'apparition d'une mutation spontanée au niveau du récepteur à la leptine. Or, la leptine est une adipokine importante dans la modulation du contenu en triglycéride hépatique (Guerre-Millo M., 2002). En effet, il a été démontré que la leptine réduit cette accumulation dans un modèle de souris A-ZIP/F-1 présentant une lipodystrophie sévère. De même, la surexpression du récepteur à la leptine dans le foie stéatosique de rats Zucker obèses a diminué l'accumulation de triglycérides hépatique (Ebihara K. et al, 2001 ; Lee Y. et al, 2001). Au vu de ces données, il n'est alors pas surprenant que nos rats obèses développent une stéatose hépatique.



**Figure 18 : Le régime hydraté empêche la survenue d'une stéatose chez les rats Zucker obèses**

A) Images représentatives de coupes de tissus de foie colorés à l'hématoxyline-éosine et rouge sirius. Echelle = 100µm. Les Flèches noires montrent les gouttelettes lipidiques signes d'une stéatose. B) Concentration hépatique, panneau de gauche, en triglycérides, cholestérols et glycogène et détermination du niveau d'expression en ARNm, panneau de droite des facteurs impliqués dans la synthèse des acides gras (FAS, SREBP1-c), du cholestérol (SREBP-2) et du canal transporteur de glycérol intra-hépatique (AQP9). Anova suivie par un test de Fisher post hoc : AVP vs. Contrôle (CT), \* :  $p < 0,05$  ; AVP vs. Régime hydraté (RH), § :  $p < 0,05$ , §§ :  $p < 0,001$ , §§§ :  $p < 0,0001$  ; RH vs. CT, # :  $p < 0,05$ , ## :  $p < 0,001$ , ### :  $p < 0,0001$  ; Lean vs. CT, ++ :  $p < 0,001$ , +++ :  $p < 0,0001$ .

La stéatose hépatique a souvent été associée avec l'insulino-résistance chez des sujets en surcharge pondérale ou même ayant un poids normal ainsi que dans différents modèles de souris obèses ou diabétiques (Picard F. et al, 1998 ; Shimomura I. et al, 1999 ; den Boer M. et al, 2004 ; Kotronen A. et al, 2008). Cependant dans notre modèle, les effets de la vasopressine sur l'accumulation de lipides dans le foie et la résistance à l'insuline sont dissociés. Les rats obèses avec une forte hydratation et un taux faible de vasopressine présenteraient une amélioration de la sensibilité à l'insuline comparés aux rats obèses contrôles et présentent une forte diminution de la stéatose avec une diminution marquée du contenu en cholestérol et en triglycérides. Au contraire, les rats recevant une perfusion chronique de vasopressine ont une aggravation de l'intolérance au glucose mais pas d'aggravation de la stéatose hépatique. Quoique peu commune, une dissociation semblable entre stéatose et intolérance au glucose a été décrite dans d'autres modèles murins d'obésité et de diabète non insulino-dépendant (Wendel A.A. et al, 2010 ; Moon Y.A. et al, 2012).

De précédents travaux sur vasopressine et lipogénèse ont rapporté des résultats contradictoires (Ma G.Y. et al 1975 ; Hems D.A. et al, 1975 ; Kirk C.J. et al, 1979 ; Assimacopoulos-Jeannet F. et al, 1981). Assimacopoulos-Jeannet F. et ses collaborateurs ont montré que la vasopressine augmente la lipogénèse dans des hépatocytes isolés mais, quand la concentration en lactate dans le milieu de culture est très élevée, la lipogénèse basale est augmentée et l'effet stimulateur de la vasopressine est perdu. Nous pouvons supposer que la lipogénèse est déjà stimulée de manière maximale chez nos rats Zucker obèses empêchant ainsi les effets additionnels de la vasopressine sur la lipogénèse. En revanche, une baisse du taux circulant en vasopressine pourrait diminuer la lipogénèse. La baisse d'expression des ARNm de FAS et SREBP1-c, dans le groupe traité avec un régime hydraté, suggère une diminution dans la synthèse *de novo* d'acides gras, bien qu'une diminution dans les flux d'acides gras non-estérifiés depuis le tissu adipeux vers le foie, relié à une réduction de l'effet vasoconstrictif de la vasopressine, ne peut être exclu. Cette baisse dans la disponibilité des acides gras, en addition d'une expression diminuée d'AQP9 (voie majeure d'entrée du glycérol dans les hépatocytes) est probablement responsable, au moins en partie, de la baisse du contenu en triglycérides. En relation avec l'absence de changement dans l'expression des ARNm de SREBP-2, la diminution du contenu en cholestérol dans le groupe sous régime hydraté serait due à une augmentation de sa dégradation plutôt qu'une diminution de sa synthèse.

Les voies de signalisations impliquées dans cet effet surprenant d'une forte hydratation sur la disparition de la stéatose hépatique restent à explorer. L'implication de la vasopressine comme celle d'autres hormones/cytokines sont à envisager.

## **6. Résumé**

L'Etude 3 conduite sur des rats Zucker Lean a permis de confirmer et de renforcer les résultats obtenus dans l'Etude 2. Quel que soit la souche de rat utilisée, une concentration élevée de vasopressine soutenue dans le temps induit une augmentation de la glycémie. La réponse hyperglycémique à la vasopressine est principalement liée à une action sur la glycogénolyse hépatique plutôt que sur la néoglucogénèse. Nous avons montré que cet effet est totalement annulé par un antagoniste des récepteurs V1a chez le rat Zucker Lean. Les résultats des tests de tolérance au glucose et à l'insuline suggèrent que la vasopressine puisse, à long terme, favoriser une intolérance au glucose/ résistance à l'insuline. Cette étude conduite sur 3 groupes de rats, a permis de révéler, contrairement à l'étude 2 ne comprenant pas de groupe contrôle, que l'augmentation de la prise hydrique et l'abaissement de la sécrétion endogène de vasopressine ne modifie pas la glycémie à jeun.

L'étude 4 conduite sur des rats Zucker obèses, a montré qu'un taux élevé de vasopressine favorise l'hyperinsulinémie et l'intolérance au glucose comme le reflète les réponses des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ainsi que la réponse à une charge de pyruvate. Toutefois, d'autres voies glucoformatrices peuvent intervenir, sous l'effet de la vasopressine, telles que la voie des pentoses phosphates. La diminution du taux endogène de vasopressine ne modifie pas l'intolérance au glucose mais induit une quasi disparition de la stéatose hépatique, associée à une diminution du contenu en triglycérides et cholestérol, et de l'expression des gènes de la lipolyse. Ces effets sont indépendants de la masse grasse corporelle globale qui n'est pas influencée par le niveau de vasopressine. Ces effets métaboliques se manifestent relativement rapidement, deux semaines après l'induction des traitements. Une action indirecte de la vasopressine passant par d'autres hormones comme l'apéline ou les catécholamines ne semble pas responsable des effets observés. La vasopressine ne semble pas non plus modifier le stress du réticulum endoplasmique. Les mécanismes impliqués restent à déterminer.

## Conclusion générale et Perspectives

---

La vasopressine (ou hormone antidiurétique) était connue jusqu'à présent sous deux noms et principalement pour ses effets sur la motricité vasculaire et ses effets rénaux. Nos travaux ont exploré un versant moins connu de cette hormone concernant le métabolisme glucidique.

Nous avons montré que des taux élevés de vasopressine, à long terme, augmente la glycémie chez le rat sain et aggrave l'intolérance au glucose dans un modèle de syndrome métabolique. Ces travaux permettent donc d'établir un lien de causalité entre vasopressine et désordres du métabolisme glucidique, et d'apporter une explication aux observations faites par des études chez l'homme. De plus, nous avons montré qu'une forte hydratation permet de réverser la stéatose hépatique chez le rat Zucker obèse.

Cependant à l'issue de ce travail, plusieurs questions se posent :

- A-t-on utilisé un bon modèle expérimental, n'aurait-il pas fallu augmenter la sécrétion endogène de vasopressine par déshydratation plutôt que de perfuser de la vasopressine exogène ? La dose de vasopressine perfusée n'a-t-elle pas été trop haute ?

Notre réponse est non pour les raisons suivantes :

- La déshydratation correspond à un état où l'augmentation secondaire de vasopressine ne permet pas de compenser l'insuffisance primaire des apports d'eau. Il en résulte une contraction volémique. Le protocole de perfusion chronique que nous avons choisi avait pour but de modifier les concentrations circulantes de vasopressine sans induire de déséquilibre hydrique. Les associations trouvées chez l'homme résultent d'études observationnelles qui s'appuient sur des variations interindividuelles de copeptine (vasopressine) chez un très grand nombre de sujets, dans des conditions de vie habituelles et n'impliquent pas de déshydratation forcée.
- Pour des raisons pratiques et des raisons d'éthiques, les travaux expérimentaux chez le rat ne peuvent se faire que sur un petit nombre d'animaux. La perfusion de vasopressine à une dose faible ou une déshydratation modérée n'aurait probablement pas permis de mettre en évidence des différences significatives. De plus, une déshydratation sévère n'aurait pas été permise par le comité d'Éthique.

- enfin, la déshydratation est accompagnée par une diminution de la prise alimentaire, l'influence de la vasopressine aurait alors été biaisée par une baisse de l'apport calorique.

➤ Quels sont les récepteurs impliqués ?

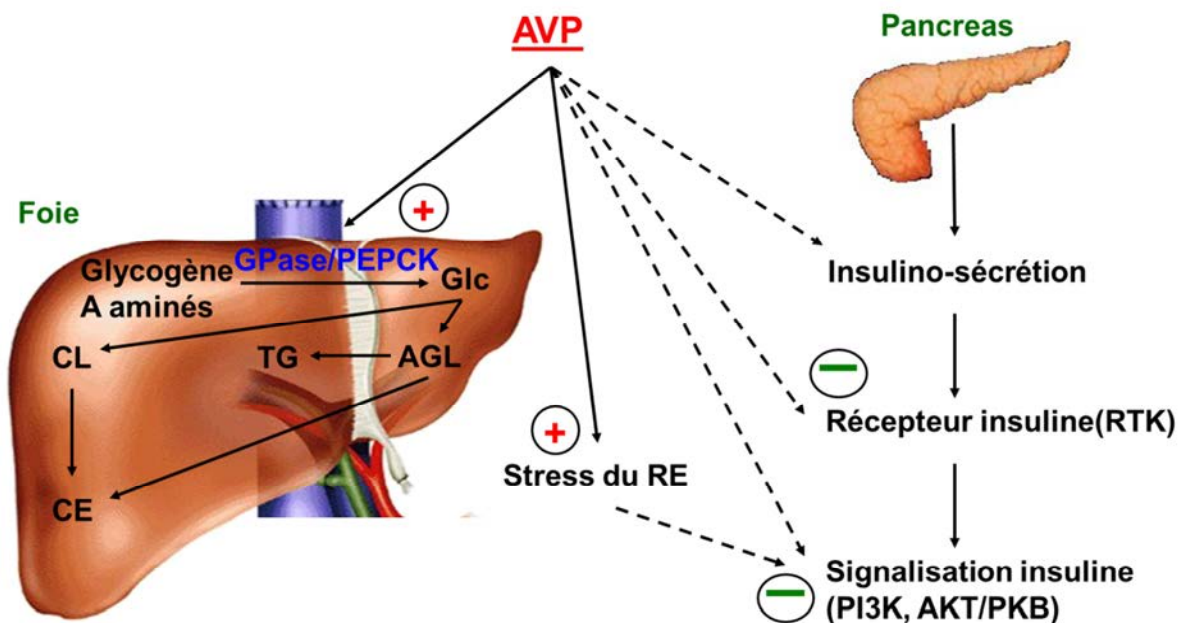
L'utilisation d'outils pharmacologiques nous a permis de démontrer que les effets hyperglycémisants de la vasopressine chez le rat sain sont médiés en partie par les récepteurs V1a hépatiques. Des résultats préliminaires suggèrent que ces récepteurs sont également impliqués dans l'intolérance au glucose du rat Zucker obèse. Des expériences avec de plus fortes doses d'antagoniste permettraient de confirmer nos résultats. De plus, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs V1b *in vivo* et/ou *ex vivo* sur des pancréas isolés permettrait d'explorer l'effet possible de la vasopressine, via les V1b, sur la sécrétion d'hormones pancréatiques chez le rat Zucker. Très récemment, des agonistes spécifiques des récepteurs V1a et V1b ont été développés. L'utilisation de ces agonistes (d(Leu<sup>4</sup>-Lys<sup>8</sup>)AVP, V1b et FE 201874, V1a) permettraient de mieux rendre compte de l'impact de ces récepteurs dans l'homéostasie glucidique. Cela est d'autant plus vrai pour les récepteurs V1b car l'antagoniste que nous avons choisi (SR 149415) dispose d'une affinité pour les récepteurs à l'ocytocine. Nos résultats chez les rats Zucker ont montré que l'antagoniste V1a inhibe l'hyperinsulinémie à jeun induite par la vasopressine et inhibe le retour à une glycémie normale au cours de l'ITT. Cela suggère un rôle possible des récepteurs V1a dans la sécrétion hormonale pancréatique. Il serait intéressant de voir l'impact d'un double traitement antagoniste V1a/antagoniste V1b sur cette sécrétion.

➤ Choix du modèle animal ?

Pour étudier l'implication de la vasopressine dans l'altération du métabolisme glucidique, j'ai travaillé sur des rats Zucker obèses qui sont des rats présentant une mutation spontanée du gène de la leptine. Cette mutation a pour conséquence de conduire à un syndrome métabolique. Toutefois, l'obésité et le syndrome métabolique ne sont pas forcément liés à une altération génétique. Ils peuvent être induits par une modification du comportement alimentaire. Afin de confirmer nos résultats, il serait également intéressant de voir si la vasopressine et le niveau d'hydratation influencent le métabolisme glucidique et la sévérité de la stéatose hépatique dans un modèle d'obésité induit par un régime riche en graisse. Par ailleurs, afin de démontrer que la vasopressine est un facteur déterminant dans le

développement du diabète de type 2, nous avons envisagé de mener une étude sur un modèle expérimental de diabète de type 2. Au cours de ma thèse, j'ai donc effectué une étude de 6 mois sur des rats Zucker Diabétiques mais qui ne m'a pas permis d'établir la moindre conclusion. En fait, les rats n'ont pas tous développer un diabète et parmi ceux qui l'avaient développé, l'intensité du diabète était très disparate. Cette expérience mérite d'être ré-effectuée car elle nous permettrait d'étudier les effets de la vasopressine non seulement sur le métabolisme glucidique mais aussi sur les deux complications majeures du diabète à savoir les complications cardiovasculaires et renales. Une étude sur des rats Goto-Kakisaki (GK), un modèle de rat diabétique de type 2 et non-obèse, pourrait également être envisagée.

➤ Quels sont les voies de signalisation impliquées ?



**Schéma 20 : Voies possibles d'action de la vasopressine sur l'altération du métabolisme glucidique**

Représentation schématique de trois voies (production hépatique de glucose, stress du réticulum et signalisation de l'insuline) sur lesquelles la vasopressine pourrait exercer son influence afin de conduire à un trouble du métabolisme glucidique générant l'insulino-résistance et à terme un diabète de type 2. Glc : glucose ; AGL : acides gras libres ; TG : triglycérides ; CL : Cholestérols libres ; CE : cholestérols estérifiés ; RTK : récepteur tyrosine kinase.

Nous avons montré que la vasopressine conduisait à une augmentation de la glycémie et une augmentation de l'expression génique d'enzymes de la glycogénolyse chez les rats Zucker Lean. Cependant chez les rats obèses, nous n'avons pas observé par RT-qPCR de modification de l'expression des gènes codant pour les enzymes clés de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. Des mesures de l'activité de ces enzymes dans des échantillons de foie, couplées à une détermination, par Western Blot, des formes phosphorylées de la glycogène phosphorylase et de la phosphorylase kinase permettraient de mieux apprécier les mécanismes hépatiques de la vasopressine. Ces études enzymatiques pourraient être menées en condition basale ou juste après une charge en produits glucoformateurs (pyruvate, lactate, glycérol). Chez les rats Zucker obèses, la vasopressine semble favoriser l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. On a alors supposé que la vasopressine pourrait agir sur l'insulino-résistance soit en induisant ou potentialisant le stress du réticulum endoplasmique, soit en inhibant la voie de signalisation de l'insuline. Les résultats n'ont pas montré d'effet sur le stress du RE ou sur la voie de signalisation de l'insuline. En ce qui concerne le stress du RE, nous avons regardé le niveau d'expression des facteurs impliqués dans cette réponse aux protéines mal-repliées. Il est possible que la quantification protéique soit d'avantage révélatrice. Nous n'avons pas pu déterminer si la vasopressine agissait sur le taux d'expression du récepteur à l'insuline à la surface des hépatocytes ou encore si elle affectait l'intensité de stimulation du récepteur. Pour ce faire, une expérience sur des hépatocytes isolés incubés avec de la vasopressine complétée ou non avec de l'insuline, durant différents temps, permettraient de répondre à ces questions. La densité des récepteurs pourrait être quantifiée par immunofluorescence, et les voies de signalisation par l'analyse par Western blot du niveau d'expression des formes phosphorylées de deux enzymes impliquées dans la signalisation insulinémique : la Protéine kinase B (PKB) et la Glycogène Synthase Kinase (GSK).

➤ Une bonne hydratation est-il un « remède miracle » contre la stéatose hépatique ?

Le résultat le plus inattendu de nos travaux a été celui concernant la disparition de la stéatose chez les rats Zucker obèses après 15 jours d'hydratation élevée. Ce résultat est bien sûr à confirmer sur d'autres modèles expérimentaux en collaboration avec des équipes spécialisées dans les NAFLD (non alcoholic fatty liver disease). Par ailleurs, il est à noter que les travaux qui se sont penchés sur le rôle de l'hydratation se sont essentiellement concentrés sur le risque de déshydratation, par exemple lors d'exercices physiques ou chez le nouveau-né.



Peu/pas de travaux se sont penchés sur les conséquences d'une faible ou d'une forte hydratation dans la population générale sur l'ensemble des hormones connues à ce jour. L'analyse du métabolome et plus particulièrement de « l'hormonolome » plasmatique ou urinaire chez des sujets ou des animaux avec différents degrés d'hydratation pourrait ouvrir la voie à de nouvelles hypothèses.

### **Thérapeutique du diabète, du rat à l'homme**

La pratique d'une activité physique et la diminution des apports caloriques sont les premières recommandations d'hygiène de vie pour la prévention et le traitement du diabète. Toutefois, ces règles de vie sont difficiles à maintenir et le recours à la médication devient plus fréquent et indispensable. Les différentes approches pharmacologiques traitent les différents axes du diabète, à savoir l'insulino-sécrétion, la résistance à l'insuline et la suppression de la production endogène de glucose. Ces traitements sont nécessaires afin de réduire la morbidité et la mortalité associées au diabète de type 2.

La metformine est le médicament le plus courant, recommandé en première attention dans le diabète de type 2. C'est le seul antidiabétique oral associé à une réduction de la mortalité. Son mode d'action principal est une réduction de la néoglucogénèse hépatique. Cependant le risque d'acidose lactique et son utilisation lors d'insuffisance rénale ou cardiaque sont controversés (Roussel R., 2012).

Au niveau du pancréas, des agents ont été développés afin d'augmenter la sécrétion en insuline par inhibition des canaux potassiques ATP sensibles. Parmi eux, on retrouve les molécules mimant des effets incrétines qui préservent la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques telles que l'Exenatide ou le Liraglutide. Toutefois, ces deux molécules présentent quelque inconvénients notamment le fait qu'elles sont administrables par injection sous-cutanée et que plusieurs injections journalières sont nécessaires. On retrouve également les inhibiteurs du DPP4 (enzyme dégradant le GLP-1) mais leurs effets sont relativement modestes. Certains cas de pancréatite ont été décrits.

Les études épidémiologiques ont permis d'identifier la copeptine/vasopressine comme facteur de risque du diabète. Nos travaux expérimentaux en démontrant un lien de causalité permettent d'envisager une utilisation « médicinale » de l'eau en tant que boisson. Ces résultats s'ajoutent aux données obtenues dans l'équipe et par d'autres groupes montrant

l'effet néfaste d'une vasopressinémie élevée dans la néphropathie diabétique et d'autres formes d'insuffisance rénale (Velho G. et al, 2013, Bankir L. et al, 2013). Les travaux chez l'animal ont permis de montrer que des récepteurs différents de la vasopressine sont impliqués dans les troubles du métabolisme glucidique (V1) et dans ceux de la fonction rénale (V2). Ces données seront à prendre en compte dans l'étude de nouvelles indications thérapeutiques des antagonistes V2 ou V1a-V2 actuellement indiqués dans l'hyponatrémie. On peut aussi supposer qu'un antagoniste V1a seul pourrait être un nouvel agent pharmacologique ; toutefois, des études sur du plus long terme sont nécessaires pour tester d'éventuels effets secondaires.

En conclusion, une augmentation de l'hydratation chez des sujets diabétiques et/ou résistants à l'insuline pourrait être une recommandation supplémentaire dans les stratégies de traitements surtout chez les sujets à risque.

## Références bibliographiques

---

- Aarab L., Siaume-Perez S. and Chabardes D.** Cell-specific coupling of PGE2 to different transduction pathways in arginine vasopressin- and glucagon-sensitive segments of the rat renal tubule. *Br J Pharmacol.* 1999, 126(4): 1041-9.
- Abbasi A., Corpeleijn E., Meijer E., Postmus D., Gansevoort R.T., Gans R.O., Struck J., Hillege H.L., Stolk R.P., Navis G. and Bakker S.J.** Sex differences in the association between plasma copeptin and incident type 2 diabetes: the Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease (PREVEND) study. *Diabetologia.* 2012, 55(7): 1963-70.
- Abu-Basha E.A., Yibchok-Anun S. and Hsu W.H.** Glucose dependency of arginine vasopressin-induced insulin and glucagon release from the perfused rat pancreas. *Metabolism.* 2002, 51(9): 1184-90.
- Acher R.** Neurophysin and neurohypophysial hormones. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1968, 170(1018): 7-16.
- Acher R.** Neurophysins: molecular and cellular aspects. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1979, 18(11): 846-60.
- Acher R. and Chauvet J.** The neurohypophysial endocrine regulatory cascade: precursors, mediators, receptors, and effectors. *Front Neuroendocrinol.* 1995, 16(3): 237-89.
- Adachi A., Niiijima A. and Jacobs H.L.** An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. *Am J Physiol.* 1976, 231(4): 1043-9.
- Aguilar-Salinas C.A., Rojas R., Gomez-Perez F.J., Mehta R., Franco A., Olaiz G. and Rull J.A.** The metabolic syndrome: a concept hard to define. *Arch Med Res.* 2005, 36(3): 223-31.
- Aguilera G., Harwood J.P., Wilson J.X., Morell J., Brown J.H. and Catt K.J.** Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J Biol Chem.* 1983, 258(13): 8039-45.
- Aguilera G. and Rabadan-diehl C.** Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. *Experimental Physiology.* 2000, 85: 19S-26S.
- Aguilera G., Subburaju S., Young S. and Chen J.** The parvocellular vasopressinergetic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog Brain Res.* 2008, 170: 29-39.
- Ahren B.** Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* 2000, 43(4): 393-410.
- Ala Y., Morin D., Mouillac B., Sabatier N., Vargas R., Cotte N., Dechaux M., Antignac C., Arthus M.F., Lonergan M., Turner M.S., Balestre M.N., Alonso G., Hibert M., Barberis C., Hendy G.N., Bichet D.G. and Jard S.** Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol.* 1998, 9(10): 1861-72.
- Almli C.R. and Weiss C.S.** Drinking behaviors: effects of lateral preoptic and lateal hypothalamic destruction. *Physiol Behav.* 1974, 13(4): 527-38.
- Alonso G., Galibert E., Boulay V., Guillou A., Jean A., Compan V. and Guillon G.** Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors. *Endocrinology.* 2009, 150(1): 239-50.

- Alvisi M., De Arcangelis V., Ciccone L., Palombi V., Alessandrini M., Nemoz G., Molinaro M., Adamo S. and Naro F.** V1a vasopressin receptor expression is modulated during myogenic differentiation. *Differentiation*. 2008, 76(4): 371-80.
- Andreelli F., Laville M., Ducluzeau P.H., Vega N., Vallier P., Khalfallah Y., Riou J.P. and Vidal H.** Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia*. 1999, 42(3): 358-64.
- Andres M., Trueba M. and Guillon G.** Pharmacological characterization of F-180: a selective human V(1a) vasopressin receptor agonist of high affinity. *Br J Pharmacol*. 2002, 135(7): 1828-36.
- Andrews W.H. and Orbach J.** Sodium receptors activating some nerves of perfused rabbit livers. *Am J Physiol*. 1974, 227(6): 1273-5.
- Antoni F.A., Holmes M.C., Makara G.B., Karteszi M. and Laszlo F.A.** Evidence that the effects of arginine-8-vasopressin (AVP) on pituitary corticotropin (ACTH) release are mediated by a novel type of receptor. *Peptides*. 1984, 5(3): 519-22.
- Antoni F.A.** Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol*. 1993, 14(2): 76-122.
- Aoyagi T., Birumachi J., Hiroyama M., Fujiwara Y., Sanbe A., Yamauchi J. and Tanoue A.** Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2007, 148(5): 2075-84.
- Aoyagi T., Izumi Y., Hiroyama M., Matsuzaki T., Yasuoka Y., Sanbe A., Miyazaki H., Fujiwara Y., Nakayama Y., Kohda Y., Yamauchi J., Inoue T., Kawahara K., Saito H., Tomita K., Nonoguchi H. and Tanoue A.** Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008, 295(1): F100-7.
- Argiles J.M.** The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Prog Lipid Res*. 1989, 28(1): 53-66.
- Armando I., Lemoine A.P., Ferrini M., Segura E.T. and Barontini M.** Repeated (isolation) stress increases tribulin-like activity in the rat. *Cell Mol Neurobiol*. 1989, 9(1): 115-22.
- Arpin-Bott M.P., Waltisperger E., Freund-Mercier M.J. and Stoeckel M.E.** Autoradiographic localization, pharmacology and ontogeny of V(1a) vasopressin binding sites in the rat kidney. *Nephron*. 1999, 83(1): 74-84.
- Asferg C.L., Andersen U.B., Linneberg A., Goetze J.P. and Jeppesen J.L.** Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin secretion, is associated with higher glucose and insulin concentrations but not higher blood pressure in obese men. *Diabet Med*. 2014, 31(6): 728-32.
- Assimakopoulos-Jeannet F., Denton R.M. and Jeanrenaud B.** Stimulation of hepatic lipogenesis and acetyl-coenzyme A carboxylase by vasopressin. *Biochem J*. 1981, 198(3): 485-90.
- Assimakopoulos-Jeannet F., Cantau B., van de Werve G., Jard S. and Jeanrenaud B.** Lack of vasopressin receptors in liver, but not in kidney, of ob/ob mice. *Biochem J*. 1983, 216(2): 475-80.
- Azizi M., Iturrioz X., Blanchard A., Peyrard S., De Mota N., Chartrel N., Vaudry H., Corvol P. and Llorens-Cortes C.** Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol*. 2008, 19(5): 1015-24.
- Bagdade J.D., Porte D., Jr. and Bierman E.L.** Diabetic lipemia. A form of acquired fat-induced lipemia. *N Engl J Med*. 1967, 276(8): 427-33.

- Bahnsen U., Oosting P., Swaab D.F., Nahke P., Richter D. and Schmale H.** A missense mutation in the vasopressin-neurophysin precursor gene cosegregates with human autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. *Embo J.* 1992, 11(1): 19-23.
- Balanescu S., Kopp P., Gaskill M.B., Morgenthaler N.G., Schindler C. and Rutishauser J.** Correlation of plasma copeptin and vasopressin concentrations in hypo-, iso-, and hyperosmolar States. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96(4): 1046-52.
- Baldwin J.M., Gorga J.C. and Lienhard G.E.** The monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Transport activity upon reconstitution. *J Biol Chem.* 1981, 256(8): 3685-9.
- Baly D.L. and Horuk R.** The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1988, 947(3): 571-90.
- Bankir L.** Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res.* 2001, 51(3): 372-90.
- Bankir L., Bardoux P. and Ahloulay M.** Vasopressin and diabetes mellitus. *Nephron.* 2001, 87(1): 8-18.
- Bankir L., Bichet D.G. and Bouby N.** Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010, 299(5): F917-28.
- Bankir L., Bouby N. and Ritz E.** Vasopressin: a novel target for the prevention and retardation of kidney disease? *Nat Rev Nephrol.* 2013, 9(4): 223-39.
- Barbeis C., Balestre M.N., Jard S., Tribollet E., Arsenijevic Y., Dreifuss J.J., Bankowski K., Manning M., Chan W.Y., Schlosser S.S. and et al.** Characterization of a novel, linear radioiodinated vasopressin antagonist: an excellent radioligand for vasopressin V1a receptors. *Neuroendocrinology.* 1995, 62(2): 135-46.
- Bardoux P., Martin H., Ahloulay M., Schmitt F., Bouby N., Trinh-Trang-Tan M.M. and Bankir L.** Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96(18): 10397-402.
- Bardoux P., Bichet D.G., Martin H., Gallois Y., Marre M., Arthus M.F., Lonergan M., Ruel N., Bouby N. and Bankir L.** Vasopressin increases urinary albumin excretion in rats and humans: involvement of V2 receptors and the renin-angiotensin system. *Nephrol Dial Transplant.* 2003a, 18(3): 497-506.
- Bardoux P., Bruneval P., Heudes D., Bouby N. and Bankir L.** Diabetes-induced albuminuria: role of antidiuretic hormone as revealed by chronic V2 receptor antagonism in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2003b, 18(9): 1755-63.
- Basu A., Basu R., Shah P., Vella A., Johnson C.M., Nair K.S., Jensen M.D., Schwenk W.F. and Rizza R.A.** Effects of type 2 diabetes on the ability of insulin and glucose to regulate splanchnic and muscle glucose metabolism: evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes.* 2000, 49(2): 272-83.
- Battezzati A., Caumo A., Martino F., Sereni L.P., Coppa J., Romito R., Ammatuna M., Regalia E., Matthews D.E., Mazzaferro V. and Luzi L.** Nonhepatic glucose production in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004, 286(1): E129-35.
- Baumann G. and Dingman J.F.** Distribution, blood transport, and degradation of antidiuretic hormone in man. *J Clin Invest.* 1976, 57(5): 1109-16.
- Beagley J., Guariguata L., Weil C. and Motala A.A.** Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013, 103(2): 150-60.
- Bell G.I., Kayano T., Buse J.B., Burant C.F., Takeda J., Lin D., Fukumoto H. and Seino S.** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care.* 1990, 13(3): 198-208.

- Benmansour M., Caillens H. and Ardaillou R.** [The effect of inhibition of angiotensin II synthesis on the response of plasma antidiuretic hormone (ADH) to the osmotic and volume-dependent stimuli in uremic patients (author's transl)]. *Nephrologie*. 1980, 1(3): 109-12.
- Bergen S.S., Jr., Sullivan R., Hilton J.G., Willis S.W., Jr. and Van Itallie T.B.** Glycogenolytic effect of vasopressin in the canine liver. *Am J Physiol*. 1960, 199: 136-8.
- Bergman R.N. and Mittelman S.D.** Central role of the adipocyte in insulin resistance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1998, 9(2-4): 205-21.
- Berkowitz B.A. and Sherman S.** Characterization of vasopressin analgesia. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982, 220(2): 329-34.
- Berntson G.G. and Berson B.S.** Antinociceptive effects of intraventricular or systemic administration of vasopressin in the rat. *Life Sci*. 1980, 26(6): 455-9.
- Berrada K., Plesnicher C.L., Luo X. and Thibonnier M.** Dynamic interaction of human vasopressin/oxytocin receptor subtypes with G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C after agonist stimulation. *J Biol Chem*. 2000, 275(35): 27229-37.
- Berthiaume N., Mika A.K. and Zinker B.A.** Development of insulin resistance and endothelin-1 levels in the Zucker fatty rat. *Metabolism*. 2003, 52(7): 845-9.
- Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P. and Ron D.** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000, 2(6): 326-32.
- Bichet D.G., Arthus M.F., Barjon J.N., Lonergan M. and Kortas C.** Human platelet fraction arginine-vasopressin. Potential physiological role. *J Clin Invest*. 1987, 79(3): 881-7.
- Bichet D.G., Razi M., Lonergan M., Arthus M.F., Papukna V., Kortas C. and Barjon J.N.** Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino[8-D-arginine] vasopressin in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. *N Engl J Med*. 1988, 318(14): 881-7.
- Bichet D.G., Arthus M.F., Lonergan M., Hendy G.N., Paradis A.J., Fujiwara T.M., Morgan K., Gregory M.C., Rosenthal W., Didwania A. and et al.** X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis. *J Clin Invest*. 1993, 92(3): 1262-8.
- Biggs W.H., 3rd, Meisenhelder J., Hunter T., Cavenee W.K. and Arden K.C.** Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96(13): 7421-6.
- Birnbaumer M., Hinrichs V. and Themmen A.P.** Development and characterization of a mouse cell line expressing the human V2 vasopressin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 1990, 4(2): 245-54.
- Birnbaumer M., Seibold A., Gilbert S., Ishido M., Barberis C., Antaramian A., Brabet P. and Rosenthal W.** Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*. 1992, 357(6376): 333-5.
- Birumachi J., Hiroyama M., Fujiwara Y., Aoyagi T., Sanbe A. and Tanoue A.** Impaired arginine-vasopressin-induced aldosterone release from adrenal gland cells in mice lacking the vasopressin V1A receptor. *Eur J Pharmacol*. 2007, 566(1-3): 226-30.
- Boden G.** Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997, 46(1): 3-10.
- Boden G.** Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001, 30(4): 801-15.

- Boden G.** Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002, 5(5): 545-9.
- Boden G.** Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011, 18(2): 139-43.
- Bodnar R.J., Wallace M.M., Kordower J.H., Nilaver G., Cort J. and Zimmerman E.A.** Modulation of nociceptive thresholds by vasopressin in the Brattleboro and normal rat. *Ann N Y Acad Sci*. 1982, 394: 735-9.
- Boer G.J., van Heerikhuize J. and van der Woude T.P.** Elevated serum oxytocin of the vasopressin-deficient Brattleboro rat is present throughout life and is not sensitive to treatment with vasopressin. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1988, 117(4): 442-50.
- Bollen M., Keppens S. and Stalmans W.** Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J*. 1998, 336 (Pt 1): 19-31.
- Born J., Pietrowsky R. and Fehm H.L.** Neuropsychological effects of vasopressin in healthy humans. *Prog Brain Res*. 1998, 119: 619-43.
- Bosca L., Challiss R.A. and Newsholme E.A.** The effect of fructose 2,6-bisphosphate on muscle fructose-1,6-bisphosphatase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1985, 828(2): 151-4.
- Bouby N., Bankir L., Trinh-Trang-Tan M.M., Minuth W.W. and Kriz W.** Selective ADH-induced hypertrophy of the medullary thick ascending limb in Brattleboro rats. *Kidney Int*. 1985, 28(3): 456-66.
- Bouby N., Bachmann S., Bichet D. and Bankir L.** Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol*. 1990, 258 (4 Pt 2): F973-9.
- Bouby N., Ahloulay M., Nsegbe E., Dechaux M., Schmitt F. and Bankir L.** Vasopressin increases glomerular filtration rate in conscious rats through its antidiuretic action. *J Am Soc Nephrol*. 1996, 7(6): 842-51.
- Boudier J.L.** [Cytophysiology of secretion in the posterior pituitary gland of the rat. Ultrastructural study after stimulation in vivo]. *J Neural Transm*. 1974, 35(1): 53-82.
- Bournat J.C. and Brown C.W.** Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010, 17(5): 446-52.
- Bourque C.W.** Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci*. 2008, 9(7): 519-31.
- Bowen-Pidgeon D., Innamorati G., Sadeghi H.M. and Birnbaumer M.** Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors. *Mol Pharmacol*. 2001, 59(6): 1395-401.
- Breslow E. and Walter R.** Binding properties of bovine neurophysins I and II: an equilibrium dialysis study. *Mol Pharmacol*. 1972, 8(1): 75-81.
- Breslow E.** On the mechanism of binding of neurohypophyseal hormones and analogs to neurophysins. *Ann N Y Acad Sci*. 1975, 248: 423-41.
- Breyer M.D. and Ando Y.** Hormonal signaling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. *Annu Rev Physiol*. 1994, 56: 711-39.
- Briley E.M., Lolait S.J., Axelrod J. and Felder C.C.** The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides*. 1994, 27(1): 63-74.
- Brudieux R., Krifi M.N. and Laulin J.P.** Release of aldosterone and corticosterone from the adrenal cortex of the Brattleboro rat in response to administration of ACTH. *J Endocrinol*. 1986, 111(3): 375-81.
- Bryant N.J., Govers R. and James D.E.** Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002, 3(4): 267-77.

- Buggy J. and Jonhson A.K.** Preoptic-hypothalamic periventricular lesions: thirst deficits and hyponatremia. *Am J Physiol.* 1977, 233(1): R44-52.
- Burbach J.P., Luckman S.M., Murphy D. and Gainer H.** Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophyseal system. *Physiol Rev.* 2001, 81(3): 1197-267.
- Burcelin R., Katz E.B. and Charron M.J.** Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab.* 1996, 22(6): 373-96.
- Burn J.H.** The modification of the action of insulin by pituitary extract and other substances. *J Physiol.* 1923, 57(5): 318-29.
- Butler P.C. and Rizza R.A.** Contribution to postprandial hyperglycemia and effect on initial splanchnic glucose clearance of hepatic glucose cycling in glucose-intolerant or NIDDM patients. *Diabetes.* 1991, 40(1): 73-81.
- Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A. and Butler P.C.** Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003, 52(1): 102-10.
- Cai D., Yuan M., Frantz D.F., Melendez P.A., Hansen L., Lee J. and Shoelson S.E.** Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005, 11(2): 183-90.
- Caillens H., Jaffray P., Benoit M.O., Ekindjian O.G., Souciet C. and Leger L.** [A study of the specificity of amylases. Measurement of pancreatic isoamylases (author's transl)]. *Nouv Presse Med.* 1980, 9(41): 3079-81.
- Caldwell H.K., Lee H.J., Macbeth A.H. and Young W.S., 3rd.** Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 2008, 84(1): 1-24.
- Cantau B., Keppens S., de Wulf H. and Jard S.** (3H)-vasopressin binding to isolated rat hepatocytes and membranes: regulation by GTP and relation to glycogen phosphorylase activation. *J Recept Res.* 1980, 1(2): 137-68.
- Cantau B., Guillon G., Mathieu M.N., Vidal-Chicot D. and Chevillard C.** Reduction in hepatic but not in renal and vascular vasopressin receptor number in hyperinsulinemic mice and rats. *Mol Cell Endocrinol.* 1984, 38(2-3): 131-9.
- Capra J.D., Kehoe J.M., Kotelchuck D., Walter R. and Breslow E.** Evolution of neurophysin proteins: the partial sequence of bovine neurophysin-I (vasopressin-oxytocin-carrier proteins-automated amino-acid-sequence analysis-homology-protein evolution). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972, 69(2): 431-4.
- Carmosino M., Brooks H.L., Cai Q., Davis L.S., Opalenik S., Hao C. and Breyer M.D.** Axial heterogeneity of vasopressin-receptor subtypes along the human and mouse collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007, 292(1): F351-60.
- Carruthers A., DeZutter J., Ganguly A. and Devaskar S.U.** Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297(4): E836-48.
- Cassin S. and Perks A.M.** Amiloride inhibits arginine vasopressin-induced decrease in fetal lung liquid secretion. *J Appl Physiol (1985).* 1993, 75(5): 1925-9.
- Cersosimo E., Judd R.L. and Miles J.M.** Insulin regulation of renal glucose metabolism in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1994, 93(6): 2584-9.
- Cha J.Y. and Repa J.J.** The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem.* 2007, 282(1): 743-51.
- Chakrabarti P., English T., Shi J., Smas C.M. and Kandror K.V.** Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes.* 2010, 59(4): 775-81.



- Changya L., Gallacher D.V., Irvine R.F., Potter B.V. and Petersen O.H.** Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate is essential for sustained activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  current in single internally perfused mouse lacrimal acinar cells. *J Membr Biol.* 1989, 109(1): 85-93.
- Cheeseman C.** GLUT7: a new intestinal facilitated hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 295(2): E238-41.
- Chen T.H., Lee B. and Hsu W.H.** Arginine vasopressin-stimulated insulin secretion and elevation of intracellular  $\text{Ca}^{++}$  concentration in rat insulinoma cells: influences of a phospholipase C inhibitor 1-[6-[[17 beta-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U-73122) and a phospholipase A2 inhibitor N-(p-amylcinnamoyl)anthranilic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994, 270(3): 900-4.
- Chen G., Liang G., Ou J., Goldstein J.L. and Brown M.S.** Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(31): 11245-50.
- Chen J., Young S., Subburaju S., Sheppard J., Kiss A., Atkinson H., Wood S., Lightman S., Serradeil-Le Gal C. and Aguilera G.** Vasopressin does not mediate hypersensitivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Ann NY Acad Sci.* 2008, 1148: 349-59.
- Cheng L.L., Stoev S., Manning M., Derick S., Pena A., Mimoun M.B. and Guillon G.** Design of potent and selective agonists for the human vasopressin V1b receptor based on modifications of [deamino-cys1]arginine vasopressin at position 4. *J Med Chem.* 2004, 47(9): 2375-88.
- Chibalin A.V., Leng Y., Vieira E., Krook A., Bjornholm M., Long Y.C., Kotova O., Zhong Z., Sakane F., Steiler T., Nylen C., Wang J., Laakso M., Topham M.K., Gilbert M., Wallberg-Henriksson H. and Zierath J.R.** Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell.* 2008, 132(3): 375-86.
- Chini B., Mouillac B., Ala Y., Balestre M.N., Cotte N., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Elands J., Hibert M., Manning M. and et al.** Molecular basis for agonist selectivity in the vasopressin/oxytocin receptor family. *Adv Exp Med Biol.* 1995, 395: 321-8.
- Christ B., Nath A., Bastian H. and Jungermann K.** Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin. *Eur J Biochem.* 1988, 178(2): 373-9.
- Chu C.A., Sindelar D.K., Igawa K., Sherck S., Neal D.W., Emshwiller M. and Cherrington A.D.** The direct effects of catecholamines on hepatic glucose production occur via  $\alpha(1)$ - and  $\beta(2)$ -receptors in the dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000, 279(2): E463-73.
- Clair C., Tran D., Boucherie S., Claret M., Tordjmann T. and Combettes L.** Hormone receptor gradients supporting directional  $\text{Ca}^{2+}$  signals: direct evidence in rat hepatocytes. *J Hepatol.* 2003, 39(4): 489-95.
- Clark G.A.** The origin of the glucose in the hyperglycaemia induced by pituitrin. *J Physiol.* 1928, 64(4): 324-30.
- Clarke S.D. and Jump D.B.** Regulation of gene transcription by polyunsaturated fatty acids. *Prog Lipid Res.* 1993, 32(2): 139-49.
- Coburn P.C. and Stricker E.M.** Osmoregulatory thirst in rats after lateral preoptic lesions. *J Comp Physiol Psychol.* 1978, 92(2): 350-61.
- Colson P.H., Bernard C., Struck J., Morgenthaler N.G., Albat B. and Guillon G.** Post cardiac surgery vasoplegia is associated with high preoperative copeptin plasma concentration. *Critical Care.* 2011, 15: R255-63.

- Colville C.A., Seatter M.J., Jess T.J., Gould G.W. and Thomas H.M.** Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J.* 1993, 290 (Pt 3): 701-6.
- Cook D.L., Ikeuchi M. and Fujimoto W.Y.** Lowering of pHi inhibits Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature.* 1984, 311(5983): 269-71.
- Coppack S.W., Jensen M.D. and Miles J.M.** In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res.* 1994, 35(2): 177-93.
- Cowley A.W., Jr., Quillen E.Q., Jr. and Skelton M.M.** Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Fed Proc.* 1983, 42(15): 3170-6.
- Cowley A.W., Jr.** Control of the renal medullary circulation by vasopressin V1 and V2 receptors in the rat. *Exp Physiol.* 2000, 85 Spec No(223S-231S).
- Craighead M., Milne R., Campbell-Wan L., Watson L., Presland J., Thomson F.J., Marston H.M. and Macsweeney C.P.** Characterization of a novel and selective V1B receptor antagonist. *Prog Brain Res.* 2008, 170: 527-35.
- Croset M., Rajas F., Zitoun C., Hurot J.M., Montano S. and Mithieux G.** Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes.* 2001, 50(4): 740-6.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M. and Hemmings B.A.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995, 378(6559): 785-9.
- Cryer P.E. and Gerich J.E.** Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1985, 313(4): 232-41.
- Cryer P.E.** Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology.* 2012, 153(3): 1039-48.
- Cushman S.W. and Wardzala L.J.** Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1980, 255(10): 4758-62.
- Cusi K., Maezono K., Osman A., Pendergrass M., Patti M.E., Pratipanawatr T., DeFronzo R.A., Kahn C.R. and Mandarino L.J.** Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 2000, 105(3): 311-20.
- Daikoku R., Kunitake T., Kato K., Tanoue A., Tsujimoto G. and Kannan H.** Body water balance and body temperature in vasopressin V1b receptor knockout mice. *Auton Neurosci.* 2007, 136(1-2): 58-62.
- Darnton S.J.** Glycogen metabolism in rabbit kidney under differing physiological states. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1967, 52(4): 392-400.
- de Goeij D.C., Kvetnansky R., Whitnall M.H., Jezova D., Berkenbosch F. and Tilders F.J.** Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology.* 1991, 53(2): 150-9.
- de Keyzer Y., Auzan C., Lenne F., Beldjord C., Thibonnier M., Bertagna X. and Clauser E.** Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett.* 1994, 356(2-3): 215-20.
- De Mota N., Reaux-Le Goazigo A., El Messari S., Chartrel N., Roesch D., Dujardin C., Kordon C., Vaudry H., Moos F. and Llorens-Cortes C.** Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(28): 10464-9.

- Dean C.R., Hope D.B. and Kazic T.** Evidence for the storage of oxytocin with neurophysin-I and of vasopressin with neurophysin-II in separate neurosecretory granules. *Br J Pharmacol.* 1968, 34(1): 192P-193P.
- Decaux J.F., Antoine B. and Kahn A.** Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem.* 1989, 264(20): 11584-90.
- DeFronzo R.A., Gunnarsson R., Bjorkman O., Olsson M. and Wahren J.** Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1985, 76(1): 149-55.
- DeFronzo R.A.** Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 2004, 88(4): 787-835, ix.
- Delarue J. and Magnan C.** Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007, 10(2): 142-8.
- den Boer M., Voshol P.J., Kuipers F., Havekes L.M. and Romijn J.A.** Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24(4): 644-9.
- Deng Y. and Scherer P.E.** Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010, 1212: E1-E19.
- Dentin R., Girard J. and Postic C.** Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie.* 2005, 87(1): 81-6.
- Dentin R., Hedrick S., Xie J., Yates J., 3rd and Montminy M.** Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science.* 2008, 319(5868): 1402-5.
- Derick S., Cheng L.L., Voirol M.J., Stoev S., Giacomini M., Wo N.C., Szeto H.H., Ben Mimoun M., Andres M., Gaillard R.C., Guillon G. and Manning M.** [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. *Endocrinology.* 2002, 143(12): 4655-64.
- Despres J.P.** Health consequences of visceral obesity. *Ann Med.* 2001, 33(8): 534-41.
- Doblado M. and Moley K.H.** Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297(4): E831-5.
- Dobsa L. and Edozien K.C.** Copeptin and its potential role in diagnosis and prognosis of various diseases. *Biochem Med (Zagreb).* 2013, 23(2): 172-90.
- Douard V. and Ferraris R.P.** Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 295(2): E227-37.
- Douglas W.W., Nagasawa J. and Schulz R.A.** Coated microvesicles in neuro-secretory terminals of posterior pituitary glands shed their coats to become smooth "synaptic" vesicles. *Nature.* 1971, 232(5309): 340-1.
- Douglas W.W.** How do neurones secrete peptides? Exocytosis and its consequences, including "synaptic vesicle" formation, in the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Prog Brain Res.* 1973, 39: 21-39.
- Douglas W.W.** Involvement of calcium in exocytosis and the exocytosis--vesiculation sequence. *Biochem Soc Symp.* 1974, 39: 1-28.
- Dray C., Knauf C., Daviaud D., Waget A., Boucher J., Buleon M., Cani P.D., Attane C., Guigne C., Carpenne C., Burcelin R., Castan-Laurell I. and Valet P.** Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2008, 8(5): 437-45.

- Drougard A., Duparc T., Brenachot X., Carneiro L., Gouaze A., Fournel A., Geurts L., Cadoudal T., Prats A.C., Penicaud L., Vieau D., Lesage J., Leloup C., Benani A., Cani P.D., Valet P. and Knauf C.** Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2013, 20(4): 557-73.
- Dunn F.L., Brennan T.J., Nelson A.E. and Robertson G.L.** The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest*. 1973, 52(12): 3212-9.
- Dunning B.E., Moltz J.H. and Fawcett C.P.** Modulation of insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas by the neurohypophysial hormones and by desamino-D-arginine vasopressin (DDAVP). *Peptides*. 1984a, 5(5): 871-5.
- Dunning B.E., Moltz J.H. and Fawcett C.P.** Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release. *Am J Physiol*. 1984b, 246(1 Pt 1): E108-14.
- Durham S.K., Suwanichkul A., Scheimann A.O., Yee D., Jackson J.G., Barr F.G. and Powell D.R.** FKHR binds the insulin response element in the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter. *Endocrinology*. 1999, 140(7): 3140-6.
- Ebihara K., Ogawa Y., Masuzaki H., Shintani M., Miyanaga F., Aizawa-Abe M., Hayashi T., Hosoda K., Inoue G., Yoshimasa Y., Gavrilo O., Reitman M.L. and Nakao K.** Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*. 2001, 50(6): 1440-8.
- Ecelbarger C.A., Kim G.H., Terris J., Masilamani S., Mitchell C., Reyes I., Verbalis J.G. and Knepper M.A.** Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000, 279(1): F46-53.
- Eid A., Bodin S., Ferrier B., Delage H., Boghossian M., Martin M., Baverel G. and Conjard A.** Intrinsic gluconeogenesis is enhanced in renal proximal tubules of Zucker diabetic fatty rats. *J Am Soc Nephrol*. 2006, 17(2): 398-405.
- Ekberg K., Landau B.R., Wajngot A., Chandramouli V., Efendic S., Brunengraber H. and Wahren J.** Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*. 1999, 48(2): 292-8.
- El-Maghrabi M.R., Lange A.J., Kummel L. and Pilkis S.J.** The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. Structure and regulation of expression. *J Biol Chem*. 1991, 266(4): 2115-20.
- El-Maghrabi M.R., Noto F., Wu N. and Manes N.** 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: suiting structure to need, in a family of tissue-specific enzymes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001, 4(5): 411-8.
- Enhörning S., Leosdottir M., Wallstrom P., Gullberg B., Berglund G., Wirfalt E. and Melander O.** Relation between human vasopressin 1a gene variance, fat intake, and diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2009, 89(1): 400-6.
- Enhörning S., Wang T.J., Nilsson P.M., Almgren P., Hedblad B., Berglund G., Struck J., Morgenthaler N.G., Bergmann A., Lindholm E., Groop L., Lyssenko V., Orho-Melander M., Newton-Cheh C. and Melander O.** Plasma copeptin and the risk of diabetes mellitus. *Circulation*. 2010, 121(19): 2102-8.
- Enhörning S., Struck J., Wirfalt E., Hedblad B., Morgenthaler N.G. and Melander O.** Plasma copeptin, a unifying factor behind the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011, 96(7): E1065-72.
- Enhörning S., Bankir L., Bouby N., Struck J., Hedblad B., Persson M., Morgenthaler N.G., Nilsson P.M. and Melander O.** Copeptin, a marker of vasopressin, in abdominal obesity, diabetes and microalbuminuria: the prospective Malmo Diet and Cancer Study cardiovascular cohort. *Int J Obes (Lond)*. 2013, 37(4): 598-603.

- Eriksson K.F. and Lindgarde F.** Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia*. 1991, 34(12): 891-8.
- Erlenbach I. and Wess J.** Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. *J Biol Chem*. 1998, 273(41): 26549-58.
- Fay M.J., Du J., Yu X. and North W.G.** Evidence for expression of vasopressin V2 receptor mRNA in human lung. *Peptides*. 1996, 17(3): 477-81.
- Fernandes S., Bruneval P., Hagege A., Heudes D., Ghostine S. and Bouby N.** Chronic V2 vasopressin receptor stimulation increases basal blood pressure and exacerbates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Endocrinology*. 2002, 143(7): 2759-66.
- Ferre P., Burnol A.F., Leturque A., Terretaz J., Penicaud L., Jeanrenaud B. and Girard J.** Glucose utilization in vivo and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. *Biochem J*. 1986, 233(1): 249-52.
- Ferris C.F., Lu S.F., Messenger T., Guillon C.D., Heindel N., Miller M., Koppel G., Robert Bruns F. and Simon N.G.** Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006, 83(2): 169-74.
- Fishman J.B., Dickey B.F., Bucher N.L. and Fine R.E.** Internalization, recycling, and redistribution of vasopressin receptors in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1985, 260(23): 12641-6.
- Florez J.C., Jablonski K.A., Bayley N., Pollin T.I., de Bakker P.I., Shuldiner A.R., Knowler W.C., Nathan D.M. and Altshuler D.** TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med*. 2006, 355(3): 241-50.
- Folli F., Saad M.J., Backer J.M. and Kahn C.R.** Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993, 92(4): 1787-94.
- Folny V., Raufaste D., Lukovic L., Pouzet B., Rochard P., Pascal M. and Serradeil-Le Gal C.** Pancreatic vasopressin V1b receptors: characterization in In-R1-G9 cells and localization in human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003, 285(3): E566-76.
- Forsling M.L., Martin M.J., Sturdy J.C. and Burton A.M.** Observations on the release and clearance of neurophysin and the neurohypophysial hormones in the rat. *J Endocrinol*. 1973, 57(2): 307-15.
- Forsling M.L. and Aziz L.A.** Release of vasopressin in response to hypoxia and the effect of aminergic and opioid antagonists. *J Endocrinol*. 1983, 99(1): 77-86.
- Foufelle F. and Ferre P.** New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*. 2002, 366(Pt 2): 377-91.
- Foufelle F. and Ferre P.** [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*. 2007, 23(3): 291-6.
- Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., Onishi Y., Ono H., Funaki M., Inukai K., Fukushima Y., Kikuchi M., Oka Y. and Asano T.** MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem*. 2001, 276(23): 19800-6.

- Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., Onishi Y., Ono H., Abe M., Shojima N., Fukushima Y., Kikuchi M., Oka Y. and Asano T.** Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2003, 17(3): 487-97.
- Fujiwara Y., Hiroyama M., Sanbe A., Aoyagi T., Birumachi J., Yamauchi J., Tsujimoto G. and Tanoue A.** Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *J Physiol.* 2007, 584(Pt 1): 235-44.
- Gaillard R.C., Schoenenberg P., Favrod-Coune C.A., Muller A.F., Marie J., Bockaert J. and Jard S.** Properties of rat anterior pituitary vasopressin receptors: relation to adenylate cyclase and the effect of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81(9): 2907-11.
- Galanth C., Hus-Citharel A., Li B. and Llorens-Cortes C.** Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr Pharm Des.* 2012, 18(6): 789-98.
- Gallo-Payet N. and Guillon G.** Regulation of adrenocortical function by vasopressin. *Horm Metab Res.* 1998, 30(6-7): 360-7.
- Ganz M.B., Pekar S.K., Perfetto M.C. and Sterzel R.B.** Arginine vasopressin promotes growth of rat glomerular mesangial cells in culture. *Am J Physiol.* 1988, 255 (5 Pt 2): F898-906.
- Gao Z.Y., Drews G., Nenquin M., Plant T.D. and Henquin J.C.** Mechanisms of the stimulation of insulin release by arginine-vasopressin in normal mouse islets. *J Biol Chem.* 1990, 265(26): 15724-30.
- Gao Z.Y., Gerard M. and Henquin J.C.** Glucose- and concentration-dependence of vasopressin-induced hormone release by mouse pancreatic islets. *Regul Pept.* 1992, 38(1): 89-98.
- Gerich J.E.** Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1993, 7(3): 551-86.
- Ghosh P.M., Mikhailova M., Bedolla R. and Kreisberg J.I.** Arginine vasopressin stimulates mesangial cell proliferation by activating the epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001, 280(6): F972-9.
- Ginsburg M. and Ireland M.** Binding of Vasopressin and Oxytocin to Protein in Extracts of Bovine and Rabbit Neurohypophyses. *J Endocrinol.* 1964, 30: 131-45.
- Girard J., Perdereau D., Foufelle F., Prip-Buus C. and Ferre P.** Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *Faseb J.* 1994, 8(1): 36-42.
- Goldsmith S.R., Katz A. and Crooks P.A.** Response of plasma arginine vasopressin to nicotine in normal man. *Clin Pharmacol Ther.* 1988, 44(4): 478-81.
- Goldstein B.J., Bittner-Kowalczyk A., White M.F. and Harbeck M.** Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem.* 2000, 275(6): 4283-9.
- Gould G.W. and Holman G.D.** The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J.* 1993, 295 (Pt 2): 329-41.
- Grant P.J., Hughes J.R., Dean H.G., Davies J.A. and Prentice C.R.** Vasopressin and catecholamine secretion during apomorphine-induced nausea mediate acute changes in haemostatic function in man. *Clin Sci (Lond).* 1986, 71(5): 621-4.
- Gray N.E., Lam L.N., Yang K., Zhou A.Y., Koliwad S. and Wang J.C.** Angiopoietin-like 4 (Angptl4) protein is a physiological mediator of intracellular lipolysis in murine adipocytes. *J Biol Chem.* 2012, 287(11): 8444-56.
- Grazzini E., Lodboerer A.M., Perez-Martin A., Joubert D. and Guillon G.** Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology.* 1996, 137(9): 3906-14.

- Grazzini E., Boccara G., Joubert D., Trueba M., Durroux T., Guillon G., Gallo-Payet N., Chouinard L., Payet M.D. and Serradeil Le Gal C.** Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol.* 1998, 449: 325-34.
- Grazzini E., Breton C., Derick S., Andres M., Raufaste D., Rickwaert F., Boccara G., Colson P., Guerineau N.C., Serradeil-le Gal C. and Guillon G.** Vasopressin receptors in human adrenal medulla and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84(6): 2195-203.
- Griebel G., Simiand J., Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Pascal M., Scatton B., Maffrand J.P. and Soubrie P.** Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(9): 6370-5.
- Griffante C., Green A., Curcuruto O., Haslam C.P., Dickinson B.A. and Arban R.** Selectivity of d[Cha4]AVP and SSR149415 at human vasopressin and oxytocin receptors: evidence that SSR149415 is a mixed vasopressin V1b/oxytocin receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2005, 146(5): 744-51.
- Griffin M.E., Marcucci M.J., Cline G.W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L.J., Kraegen E.W., White M.F. and Shulman G.I.** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999, 48(6): 1270-4.
- Groop L.C., Bonadonna R.C., DelPrato S., Ratheiser K., Zyck K., Ferrannini E. and DeFronzo R.A.** Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1989, 84(1): 205-13.
- Guerre-Millo M.** Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest.* 2002, 25(10): 855-61.
- Guillon G., Grazzini E., Andres M., Breton C., Trueba M., Serradeil-LeGal C., Boccara G., Derick S., Chouinard L. and Gallo-Payet N.** Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res.* 1998, 24(3-4): 703-10.
- Hage Hassan R., Bourron O. and Hajduch E.** Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World J Diabetes.* 2014, 5(3): 244-57.
- Hagopian K., Ramsey J.J. and Weindruch R.** Enzymes of glycerol and glyceraldehyde metabolism in mouse liver: effects of caloric restriction and age on activities. *Biosci Rep.* 2008, 28(2): 107-15.
- Hajduch E., Turban S., Le Liepvre X., Le Lay S., Lipina C., Dimopoulos N., Dugail I. and Hundal H.S.** Targeting of PKC $\zeta$  and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J.* 2008, 410(2): 369-79.
- Hammer M., Ladefoged J. and Olgaard K.** Relationship between plasma osmolality and plasma vasopressin in human subjects. *Am J Physiol.* 1980, 238(4): E313-7.
- Hara Y., Battey J. and Gainer H.** Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990, 8(4): 319-24.
- Harding H.P., Novoa I., Bertolotti A., Zeng H., Zhang Y., Urano F., Jousse C. and Ron D.** Translational regulation in the cellular response to biosynthetic load on the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2001, 66: 499-508.
- Harland D., Gardiner S.M. and Bennett T.** Differential cardiovascular effects of centrally administered vasopressin in conscious Long Evans and Brattleboro rats. *Circ Res.* 1989, 65(4): 925-33.

- Haus J.M., Kashyap S.R., Kasumov T., Zhang R., Kelly K.R., Defronzo R.A. and Kirwan J.P.** Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009, 58(2): 337-43.
- Hawthorn J., Nussey S.S., Henderson J.R. and Jenkins J.S.** Immunohistochemical localization of oxytocin and vasopressin in the adrenal glands of rat, cow, hamster and guinea pig. *Cell Tissue Res*. 1987, 250(1): 1-6.
- Hawtin S.R., Simms J., Conner M., Lawson Z., Parslow R.A., Trim J., Sheppard A. and Wheatley M.** Charged extracellular residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, are required for ligand binding, receptor activation, and cell-surface expression. *J Biol Chem*. 2006, 281(50): 38478-88.
- Hellerstein M.K., Schwarz J.M. and Neese R.A.** Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu Rev Nutr*. 1996, 16(523-57).
- Helmrich S.P., Ragland D.R., Leung R.W. and Paffenbarger R.S., Jr.** Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1991, 325(3): 147-52.
- Hems D.A. and Whitton P.D.** Stimulation by vasopressin of glycogen breakdown and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J*. 1973, 136(3): 705-9.
- Hems D.A., Whitton P.D. and Ma G.Y.** Metabolic actions of vasopressin, glucagon and adrenalin in the intact rat. *Biochim Biophys Acta*. 1975, 411(1): 155-64.
- Hems D.A., Rodrigues L.M. and Whitton P.D.** Glycogen phosphorylase, glucose output and vasoconstriction in the perfused rat liver. Concentration-dependence of actions of adrenaline, vasopressin and angiotensin II. *Biochem J*. 1976, 160(2): 367-74.
- Henquin J.C., Anello M. and Sato Y.** [ATP-dependent potassium channels and insulin secretion: essential but not sufficient role]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*. 2000, 13-24.
- Hensen J., Hader O., Bahr V. and Oelkers W.** Effects of incremental infusions of arginine vasopressin on adrenocorticotropin and cortisol secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988, 66(4): 668-71.
- Hernando F., Schoots O., Lolait S.J. and Burbach J.P.** Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology*. 2001, 142(4): 1659-68.
- Hers H.G. and Hue L.** Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu Rev Biochem*. 1983, 52: 617-53.
- Heyes M.P., Farber M.O., Manfredi F., Robertshaw D., Weinberger M., Fineberg N. and Robertson G.** Acute effects of hypoxia on renal and endocrine function in normal humans. *Am J Physiol*. 1982, 243(3): R265-70.
- Hirata Y., Suzuki Y., Hayakawa H., Suzuki E., Kimura K., Goto A., Kangawa K., Matsuo H. and Omata M.** Participation of endogenous atrial natriuretic peptide in the regulation of urinary protein excretion in experimental diabetic rats. *Clin Sci (Lond)*. 1995, 88(4): 413-9.
- Hiroshima M., Aoyagi T., Fujiwara Y., Birumachi J., Shigematsu Y., Kiwaki K., Tasaki R., Endo F. and Tanoue A.** Hypermetabolism of fat in V1a vasopressin receptor knockout mice. *Mol Endocrinol*. 2007, 21(1): 247-58.
- Hiroshima M., Fujiwara Y., Nakamura K., Aoyagi T., Mizutani R., Sanbe A., Tasaki R. and Tanoue A.** Altered lipid metabolism in vasopressin V1B receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol*. 2009, 602(2-3): 455-61.
- Hirsch A.T., Dzau V.J., Majzoub J.A. and Creager M.A.** Vasopressin-mediated forearm vasodilation in normal humans. Evidence for a vascular vasopressin V2 receptor. *J Clin Invest*. 1989, 84(2): 418-26.



- Hoffert J.D., Fenton R.A., Moeller H.B., Simons B., Tchapyjnikov D., McDill B.W., Yu M.J., Pisitkun T., Chen F. and Knepper M.A.** Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. *J Biol Chem.* 2008, 283(36): 24617-27.
- Holman G.D., Kozka I.J., Clark A.E., Flower C.J., Saltis J., Habberfield A.D., Simpson I.A. and Cushman S.W.** Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. *J Biol Chem.* 1990, 265(30): 18172-9.
- Hooper S.B., Wallace M.J. and Harding R.** Amiloride blocks the inhibition of fetal lung liquid secretion caused by AVP but not by asphyxia. *J Appl Physiol (1985).* 1993, 74(1): 111-5.
- Hope D.B. and Walti M.** (2-(3-Nitrotyrosine))oxytocin, a weakly active analogue of the hormone bound by neurophysin. *Biochem J.* 1973, 135(1): 241-3.
- Howl J., Kerr I.D., Chan C.H. and Wheatley M.** A selective biotinylated probe for V1a vasopressin receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 1991, 77(1-3): 123-31.
- Hunsballe J.M., Rittig S., Pedersen E.B. and Djurhuus J.C.** Smokeless nicotinic stimulation of vasopressin secretion in patients with persisting nocturnal enuresis and controls. *Scand J Urol Nephrol.* 2001, 35(2): 117-21.
- Hus-Citharel A., Bouby N., Frugiere A., Bodineau L., Gasc J.M. and Llorens-Cortes C.** Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int.* 2008, 74(4): 486-94.
- Husain M.K., Frantz A.G., Ciarochi F. and Robinson A.G.** Nicotine-stimulated release of neurophysin and vasopressin in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975, 41(06): 1113-7.
- Hvidberg A., Djurup R. and Hilsted J.** Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994, 46(1): 15-7.
- Idris I., Gray S. and Donnelly R.** Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 2001, 44(6): 659-73.
- Iida M., Murakami T., Ishida K., Mizuno A., Kuwajima M. and Shima K.** Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996a, 224(2): 597-604.
- Iida M., Murakami T., Ishida K., Mizuno A., Kuwajima M. and Shima K.** Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996b, 222(1): 19-26.
- Ikeda Y., Olsen G.S., Ziv E., Hansen L.L., Busch A.K., Hansen B.F., Shafrir E. and Mosthaf-Seedorf L.** Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in *Psammomys obesus*: overexpression of protein kinase C $\epsilon$  in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes.* 2001, 50(3): 584-92.
- Imrie C.G.** The action of extract of pituitary on the blood sugar after pancreatectomy. *J Physiol.* 1929, 67(3): 264-9.
- Innamorati G., Sadeghi H. and Birnbaumer M.** Transient phosphorylation of the V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 1998a, 273(12): 7155-61.
- Innamorati G., Sadeghi H.M., Tran N.T. and Birnbaumer M.** A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998b, 95(5): 2222-6.

- Innamorati G., Sadeghi H. and Birnbaumer M.** Phosphorylation and recycling kinetics of G protein-coupled receptors. *J Recept Signal Transduct Res.* 1999, 19(1-4): 315-26.
- Inoue T., Nonoguchi H. and Tomita K.** Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res.* 2001, 51(3): 470-80.
- Itani S.I., Ruderman N.B., Schmieder F. and Boden G.** Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes.* 2002, 51(7): 2005-11.
- Ito M., Mori Y., Oiso Y. and Saito H.** A single base substitution in the coding region for neurophysin II associated with familial central diabetes insipidus. *J Clin Invest.* 1991, 87(2): 725-8.
- Itoh S., Yamada S., Mori T., Miwa T., Tottori K., Uwahodo Y., Yamamura Y., Fukuda M., Yamamoto K., Tanoue A. and Tsujimoto G.** Attenuated stress-induced catecholamine release in mice lacking the vasopressin V1b receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006, 291(1): E147-51.
- Iynedjian P.B., Ballard F.J. and Hanson R.W.** The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat kidney cortex. The role of acid-base balance and glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1975, 250(14): 5596-603.
- Jard S., Gaillard R.C., Guillon G., Marie J., Schoenenberg P., Muller A.F., Manning M. and Sawyer W.H.** Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis. *Mol Pharmacol.* 1986, 30(2): 171-7.
- Jochberger S., Morgenthaler N.G., Mayr V.D., Luckner G., Wenzel V., Ulmer H., Schwarz S., Hasibeder W.R., Friesenecker B.E. and Dunser M.W.** Copeptin and arginine vasopressin concentrations in critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(11): 4381-6.
- Johnson M.D., Bao H.F., Helms M.N., Chen X.J., Tigue Z., Jain L., Dobbs L.G. and Eaton D.C.** Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(13): 4964-9.
- Jordan J., Tank J., Diedrich A., Robertson D. and Shannon J.R.** Vasopressin and blood pressure in humans. *Hypertension.* 2000, 36(6): E3-4.
- Joseph P.K. and Subrahmanyam K.** Effect of growth hormone, insulin, thyroxine and cortisone on renal gluconeogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 1968, 127(1): 288-91.
- Jungermann K. and Thurman R.G.** Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme.* 1992, 46(1-3): 33-58.
- Kahn B.B., Rosen A.S., Bak J.F., Andersen P.H., Damsbo P., Lund S. and Pedersen O.** Expression of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of humans with insulin-dependent diabetes mellitus: regulatory effects of metabolic factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992, 74(5): 1101-9.
- Kahn S.E., Hull R.L. and Utzschneider K.M.** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006, 444(7121): 840-6.
- Kalra S., Mukherjee J.J., Venkataraman S., Bantwal G., Shaikh S., Saboo B., Das A.K. and Ramachandran A.** Hypoglycemia: The neglected complication. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013, 17(5): 819-34.
- Kamoi K., Ishibashi M. and Yamaji T.** Thirst and plasma levels of vasopressin, angiotensin II and atrial natriuretic peptide in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1991, 11(3): 195-202.
- Karnieli E. and Armoni M.** Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 295(1): E38-45.

- Kaufman R.J., Scheuner D., Schroder M., Shen X., Lee K., Liu C.Y. and Arnold S.M.** The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002, 3(6): 411-21.
- Kawakami N., Takatsuka N., Shimizu H. and Ishibashi H.** Effects of smoking on the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Replication and extension in a Japanese cohort of male employees. *Am J Epidemiol.* 1997, 145(2): 103-9.
- Kawamata Y., Habata Y., Fukusumi S., Hosoya M., Fujii R., Hinuma S., Nishizawa N., Kitada C., Onda H., Nishimura O. and Fujino M.** Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 1538(2-3): 162-71.
- Kellett G.L., Brot-Laroche E., Mace O.J. and Leturque A.** Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr.* 2008, 28: 35-54.
- Kelley D., Mitrakou A., Marsh H., Schwenk F., Benn J., Sonnenberg G., Arcangeli M., Aoki T., Sorensen J., Berger M. and et al.** Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest.* 1988, 81(5): 1563-71.
- Kelly A.M. and Goodson J.L.** Social functions of individual vasopressin-oxytocin cell groups in vertebrates: What do we really know? *Front Neuroendocrinol.* 2014.
- Kennedy M.E. and Limbird L.E.** Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem.* 1993, 268(11): 8003-11.
- Kennelly P.J. and Krebs E.G.** Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 1991, 266(24): 15555-8.
- Keppens S. and de Wulf H.** The activation of liver glycogen phosphorylase by vasopressin. *FEBS Lett.* 1975, 51(1): 29-32.
- Keppens S., Vandenheede J.R. and De Wulf H.** On the role of calcium as second messenger in liver for the hormonally induced activation of glycogen phosphorylase. *Biochim Biophys Acta.* 1977, 496(2): 448-57.
- Khoo J.C. and Steinberg D.** Stimulation of rat liver phosphorylase kinase by micromolar concentrations of Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett.* 1975, 57(1): 68-72.
- Kim J.K., Summer S.N., Wood W.M., Brown J.L. and Schrier R.W.** Arginine vasopressin secretion with mutants of wild-type and Brattleboro rats AVP gene. *J Am Soc Nephrol.* 1997, 8(12): 1863-9.
- Kirk C.J. and Hems D.A.** Hepatic action of vasopressin: lack of a role for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. *FEBS Lett.* 1974, 47(1): 128-31.
- Kirk C.J., Verrinder T.R. and Hems D.A.** Rapid stimulation, by vasopressin and adrenaline, of inorganic phosphate incorporation into phosphatidyl inositol in isolated hepatocytes. *FEBS Lett.* 1977, 83(2): 267-71.
- Kirk C.J., Verrinder T.R. and Hems D.A.** The influence of extracellular calcium concentration on the vasopressin-stimulated incorporation of inorganic phosphate into phosphatidylinositol in hepatocyte suspensions. *Biochem Soc Trans.* 1978, 6(5): 1031-3.
- Kirk C.J. and Hems D.A.** The control by vasopressin of carbohydrate and lipid metabolism in the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1979, 583(4): 474-82.
- Klaman L.D., Boss O., Peroni O.D., Kim J.K., Martino J.L., Zabolotny J.M., Moghal N., Lubkin M., Kim Y.B., Sharpe A.H., Stricker-Krongrad A., Shulman G.I., Neel B.G. and Kahn B.B.** Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000, 20(15): 5479-89.

- Kluge M., Riedl S., Erhart-Hofmann B., Hartmann J. and Waldhauser F.** Improved extraction procedure and RIA for determination of arginine<sup>8</sup>-vasopressin in plasma: role of premeasurement sample treatment and reference values in children. *Clin Chem.* 1999, 45(1): 98-103.
- Knauf C., Drougard A., Fournel A., Duparc T. and Valet P.** Hypothalamic actions of apelin on energy metabolism: new insight on glucose homeostasis and metabolic disorders. *Horm Metab Res.* 2013, 45(13): 928-34.
- Knepper M.A.** Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol.* 1997, 272(1 Pt 2): F3-12.
- Koh H.J., Toyoda T., Didesch M.M., Lee M.Y., Sleeman M.W., Kulkarni R.N., Musi N., Hirshman M.F. and Goodyear L.J.** Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nat Commun.* 2013, 4: 1871.
- Koistinen H.A. and Zierath J.R.** Skeletal muscle insulin resistance: is it important for the pathogenesis of type 2 diabetes after all? *J Endocrinol Invest.* 2003, 26(7): 690-2.
- Koliwad S.K., Kuo T., Shipp L.E., Gray N.E., Backhed F., So A.Y., Farese R.V., Jr. and Wang J.C.** Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4, fasting-induced adipose factor) is a direct glucocorticoid receptor target and participates in glucocorticoid-regulated triglyceride metabolism. *J Biol Chem.* 2009, 284(38): 25593-601.
- Kong C., Nimmo L., Elatrozy T., Anyaoku V., Hughes C., Robinson S., Richmond W. and Elkeles R.S.** Smoking is associated with increased hepatic lipase activity, insulin resistance, dyslipidaemia and early atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2001, 156(2): 373-8.
- Koshimizu T.A., Nasa Y., Tanoue A., Oikawa R., Kawahara Y., Kiyono Y., Adachi T., Tanaka T., Kuwaki T., Mori T., Takeo S., Okamura H. and Tsujimoto G.** V1a vasopressin receptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(20): 7807-12.
- Koshimizu T.A., Nakamura K., Egashira N., Hiroyama M., Nonoguchi H. and Tanoue A.** Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev.* 2012, 92(4): 1813-64.
- Kotronen A., Seppala-Lindroos A., Bergholm R. and Yki-Jarvinen H.** Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 2008, 51(1): 130-8.
- Kovacs P. and Stumvoll M.** Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005, 19(4): 625-35.
- Krege J.H. and Katz V.L.** A proposed relationship between vasopressinase altered vasopressin and preeclampsia. *Med Hypotheses.* 1990, 31(4): 283-7.
- Krege J.H., Faber J.E., Klapper D.G., Katz V.L. and Colindres R.E.** Vasopressinase-altered vasopressin elevates arterial pressure in anesthetized rats. *Am J Perinatol.* 1993, 10(2): 160-3.
- Kriz W. and Bankir L.** ADH-induced changes in the epithelium of the thick ascending limb in Brattleboro rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Ann N Y Acad Sci.* 1982, 394: 424-34.
- Krook A., Bjornholm M., Galuska D., Jiang X.J., Fahlman R., Myers M.G., Jr., Wallberg-Henriksson H. and Zierath J.R.** Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2000, 49(2): 284-92.
- Kunkel M.T. and Peralta E.G.** Charged amino acids required for signal transduction by the m3 muscarinic acetylcholine receptor. *Embo J.* 1993, 12(10): 3809-15.

- Kurtoglu M., Maher J.C. and Lampidis T.J.** Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid Redox Signal*. 2007, 9(9): 1383-90.
- Lager I., Attvall S., Eriksson B.M., von Schenk H. and Smith U.** Studies on the insulin-antagonistic effect of catecholamines in normal man. Evidence for the importance of beta 2-receptors. *Diabetologia*. 1986, 29(7): 409-16.
- Lakka H.M., Laaksonen D.E., Lakka T.A., Niskanen L.K., Kumpusalo E., Tuomilehto J. and Salonen J.T.** The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama*. 2002, 288(21): 2709-16.
- Lambillotte C., Gilon P. and Henquin J.C.** Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest*. 1997, 99(3): 414-23.
- Land H., Schutz G., Schmale H. and Richter D.** Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor. *Nature*. 1982, 295(5847): 299-303.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E. and Haussinger D.** Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 1998, 78(1): 247-306.
- Lapante M. and Sabatini D.M.** mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(8): 3281-2.
- Laporte R., Kohan A., Heitzmann J., Wisniewska H., Toy J., La E., Tariga H., Alagarsamy S., Ly B., Dykert J., Qi S., Wisniewski K., Galyean R., Croston G., Schteingart C.D. and Riviere P.J.** Pharmacological characterization of FE 202158, a novel, potent, selective, and short-acting peptidic vasopressin V1a receptor full agonist for the treatment of vasodilatory hypotension. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011, 337(3): 786-96.
- Large V., Peroni O., Letexier D., Ray H. and Beylot M.** Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004, 30(4): 294-309.
- Larson-Meyer D.E., Newcomer B.R., Ravussin E., Volaufova J., Bennett B., Chalew S., Cefalu W.T. and Sothorn M.** Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children. *Diabetologia*. 2011, 54(4): 869-75.
- Launay J.M., Vittel D., Vidaud M., Rondot A., Mathieu M.N., Lalau-Keraly C., Cantau B. and Chevillard C.** V1a-vasopressin specific receptors on human platelets: potentiation by ADP and epinephrine and evidence for homologous down-regulation. *Thromb Res*. 1987, 45(4): 323-31.
- Laurent D., Petersen K.F., Russell R.R., Cline G.W. and Shulman G.I.** Effect of epinephrine on muscle glycogenolysis and insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in humans. *Am J Physiol*. 1998, 274(1 Pt 1): E130-8.
- Lauson H.D.** Metabolism of antidiuretic hormones. *Am J Med*. 1967, 42(5): 713-44.
- Ledderhos C., Mattson D.L., Skelton M.M. and Cowley A.W., Jr.** In vivo diuretic actions of renal vasopressin V1 receptor stimulation in rats. *Am J Physiol*. 1995, 268 (3 Pt 2): R796-807.
- Lee B., Yang C., Chen T.H., al-Azawi N. and Hsu W.H.** Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am J Physiol*. 1995, 269(6 Pt 1): E1095-100.
- Lee Y., Wang M.Y., Kakuma T., Wang Z.W., Babcock E., McCorkle K., Higa M., Zhou Y.T. and Unger R.H.** Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J Biol Chem*. 2001, 276(8): 5629-35.

- Lee A.H., Iwakoshi N.N. and Glimcher L.H.** XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(21): 7448-59.
- Lefkowitz R.J.** G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem.* 1998, 273(30): 18677-80.
- Leibowitz G., Yuli M., Donath M.Y., Nesher R., Melloul D., Cerasi E., Gross D.J. and Kaiser N.** beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2001, 50 (Suppl 1): S113-7.
- Leturque A., Brot-Laroche E. and Le Gall M.** GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 296(5): E985-92.
- Li S., Brown M.S. and Goldstein J.L.** Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(8): 3441-6.
- Liard J.F.** Vasopressin in cardiovascular control: role of circulating vasopressin. *Clin Sci (Lond).* 1984, 67(5): 473-81.
- Lin B., Morris D.W. and Chou J.Y.** Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA Cell Biol.* 1998, 17(11): 967-74.
- Liu J. and Wess J.** Different single receptor domains determine the distinct G protein coupling profiles of members of the vasopressin receptor family. *J Biol Chem.* 1996, 271(15): 8772-8.
- Lolait S.J., O'Carroll A.M., McBride O.W., Konig M., Morel A. and Brownstein M.J.** Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature.* 1992, 357(6376): 336-9.
- Lolait S.J., O'Carroll A.M. and Brownstein M.J.** Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1995a, 771: 273-92.
- Lolait S.J., O'Carroll A.M., Mahan L.C., Felder C.C., Button D.C., Young W.S., 3rd, Mezey E. and Brownstein M.J.** Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995b, 92(15): 6783-7.
- Longshaw I.D. and Pogson C.I.** The effect of steroids and ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat kidney cortex. I. Differentiation of the inductive process and characterization of enzyme activities. *J Clin Invest.* 1972, 51(9): 2277-83.
- Lundin S., Bengtsson H.I., Folkesson H.G. and Westrom B.R.** Degradation of [mercaptopyruvic acid<sup>1</sup>, D-arginine<sup>8</sup>]-vasopressin (dDAVP) in pancreatic juice and intestinal mucosa homogenate. *Pharmacol Toxicol.* 1989, 65(2): 92-5.
- Luttinger D., Hernandez D.E., Nemeroff C.B. and Prange A.J., Jr.** Peptides and nociception. *Int Rev Neurobiol.* 1984, 25: 185-241.
- Ma G.Y. and Hems D.A.** Inhibition of fatty acid synthesis and stimulation of glycogen breakdown by vasopressin in the perfused mouse liver. *Biochem J.* 1975, 152(2): 389-92.
- Ma X.M., Levy A. and Lightman S.L.** Rapid changes in heteronuclear RNA for corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin in response to acute stress. *J Endocrinol.* 1997, 152(1): 81-9.
- Mack E., Ziv E., Reuveni H., Kalman R., Niv M.Y., Jorns A., Lenzen S. and Shafrir E.** Prevention of insulin resistance and beta-cell loss by abrogating PKCepsilon-induced serine phosphorylation of muscle IRS-1 in Psammomys obesus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008, 24(7): 577-84.

- Maher J.C., Savaraj N., Priebe W., Liu H. and Lampidis T.J.** Differential sensitivity to 2-deoxy-D-glucose between two pancreatic cell lines correlates with GLUT-1 expression. *Pancreas*. 2005, 30(2): e34-9.
- Malhi H. and Kaufman R.J.** Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011, 54(4): 795-809.
- Manning M. and Sawyer W.H.** Discovery, development, and some uses of vasopressin and oxytocin antagonists. *J Lab Clin Med*. 1989, 114(6): 617-32.
- Manning M., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B. and Guillon G.** Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Prog Brain Res*. 2008, 170: 473-512.
- Manning M., Misicka A., Olma A., Bankowski K., Stoev S., Chini B., Durroux T., Mouillac B., Corbani M. and Guillon G.** Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol*. 2012, 24(4): 609-28.
- Mannucci P.M., Ruggeri Z.M., Pareti F.I. and Capitanio A.** 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet*. 1977, 1(8017): 869-72.
- Manson J.E., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz G.A., Willett W.C., Krolewski A.S., Rosner B., Hennekens C.H. and Speizer F.E.** Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet*. 1991, 338(8770): 774-8.
- Marir R., Virsolvy A., Wisniewski K., Mion J., Haddou D., Galibert E., Meraihi Z., Desarmenien M.G. and Guillon G.** Pharmacological characterization of FE 201874, the first selective high affinity rat V1A vasopressin receptor agonist. *Br J Pharmacol*. 2013, 170(2): 278-92.
- Martin G. and Baverel G.** Vasopressin promotes the metabolism of near-physiological concentration of glutamine in isolated rat liver cells. *Biosci Rep*. 1984, 4(2): 171-6.
- Marty N., Dallaporta M. and Thorens B.** Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 2007, 22: 241-51.
- Matthews E.K., Legros J.J., Grau J.D., Nordmann J.J. and Dreifuss J.J.** Release of neurohypophysial hormones by exocytosis. *Nat New Biol*. 1973, 241(107): 86-8.
- Mazzocchi G., Markowska A., Malendowicz L.K., Musajo F., Meneghelli V. and Nussdorfer G.G.** Evidence that endogenous arginine-vasopressin (AVP) is involved in the maintenance of the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993, 45(4): 251-6.
- Mc C.S. and Brobeck J.R.** Evidence for a role of the supraopticohypophyseal system in regulation of adrenocorticotrophin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954, 87(2): 318-24.
- McDill B.W., Li S.Z., Kovach P.A., Ding L. and Chen F.** Congenital progressive hydronephrosis (cph) is caused by an S256L mutation in aquaporin-2 that affects its phosphorylation and apical membrane accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103(18): 6952-7.
- Michell R.H., Kirk C.J. and Billah M.M.** Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown with particular reference to the hepatic effects of vasopressin. *Biochem Soc Trans*. 1979, 7(5): 861-5.
- Minassian C. and Mithieux G.** Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during fasting in rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1994, 109(1): 99-104.

- Mithieux G.** New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001, 4(4): 267-71.
- Mithieux G., Rajas F. and Zitoun C.** Glucose utilization is suppressed in the gut of insulin-resistant high fat-fed rats and is restored by metformin. *Biochem Pharmacol*. 2006, 72(12): 1757-62.
- Montani J.P., Liard J.F., Schoun J. and Mohring J.** Hemodynamic effects of exogenous and endogenous vasopressin at low plasma concentrations in conscious dogs. *Circ Res*. 1980, 47(3): 346-55.
- Monto F., Arce C., Noguera M.A., Ivorra M.D., Flanagan J., Roller M., Issaly N. and D'Ocon P.** Action of an extract from the seeds of *Fraxinus excelsior* L. on metabolic disorders in hypertensive and obese animal models. *Food Funct*. 2014, 5(4): 786-96.
- Moon Y.A., Liang G., Xie X., Frank-Kamenetsky M., Fitzgerald K., Koteliensky V., Brown M.S., Goldstein J.L. and Horton J.D.** The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab*. 2012, 15(2): 240-6.
- Morgan N.G., Shipp C.C. and Exton J.H.** Studies on the mechanism of inhibition of hepatic cAMP accumulation by vasopressin. *FEBS Lett*. 1983, 163(2): 277-81.
- Morgenthaler N.G., Struck J., Alonso C. and Bergmann A.** Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem*. 2006, 52(1): 112-9.
- Morino K., Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Frattini J., Shatzkes N., Neschen S., White M.F., Bilz S., Sono S., Pypaert M. and Shulman G.I.** Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. 2005, 115(12): 3587-93.
- Morino K., Neschen S., Bilz S., Sono S., Tsirigotis D., Reznick R.M., Moore I., Nagai Y., Samuel V., Sebastian D., White M., Philbrick W. and Shulman G.I.** Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Diabetes*. 2008, 57(10): 2644-51.
- Mouillac B., Chini B., Balestre M.N., Jard S., Barberis C., Manning M., Tribollet E., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Elands J. and et al.** Identification of agonist binding sites of vasopressin and oxytocin receptors. *Adv Exp Med Biol*. 1995a, 395: 301-10.
- Mouillac B., Chini B., Balestre M.N., Elands J., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Hibert M., Jard S. and Barberis C.** The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J Biol Chem*. 1995b, 270(43): 25771-7.
- Mueckler M., Caruso C., Baldwin S.A., Panico M., Blench I., Morris H.R., Allard W.J., Lienhard G.E. and Lodish H.F.** Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985, 229(4717): 941-5.
- Muller M.B., Landgraf R., Preil J., Sillaber I., Kresse A.E., Keck M.E., Zimmermann S., Holsboer F. and Wurst W.** Selective activation of the hypothalamic vasopressinergic system in mice deficient for the corticotropin-releasing hormone receptor 1 is dependent on glucocorticoids. *Endocrinology*. 2000, 141(11): 4262-9.
- Mutel E., Abdul-Wahed A., Ramamonjisoa N., Stefanutti A., Houberdon I., Cavassila S., Pilleul F., Beuf O., Gautier-Stein A., Penhoat A., Mithieux G. and Rajas F.** Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J Hepatol*. 2011a, 54(3): 529-37.



- Mutel E., Gautier-Stein A., Abdul-Wahed A., Amigo-Correig M., Zitoun C., Stefanutti A., Houberton I., Tourette J.A., Mithieux G. and Rajas F.** Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes*. 2011b, 60(12): 3121-31.
- Mutig K., Paliege A., Kahl T., Jons T., Muller-Esterl W. and Bachmann S.** Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007, 293(4): F1166-77.
- Nagasawa J., Douglas W.W. and Schulz R.A.** Ultrastructural evidence of secretion by exocytosis and of "synaptic vesicle" formation in posterior pituitary glands. *Nature*. 1970, 227(5256): 407-9.
- Nagy G., Mulchahey J.J., Smyth D.G. and Neill J.D.** The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophysial prolactin releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988, 151(1): 524-9.
- Nakamura K., Aoyagi T., Hiroyama M., Kusakawa S., Mizutani R., Sanbe A., Yamauchi J., Kamohara M., Momose K. and Tanoue A.** Both V(1A) and V(1B) vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol*. 2009, 613(1-3): 182-8.
- Nakazato Y. and Douglas W.W.** Vasopressin release from the isolated neurohypophysis induced by a calcium ionophore, X-537A. *Nature*. 1974, 249(456): 479-81.
- Nathanson M.H., Burgstahler A.D., Mennone A., Fallon M.B., Gonzalez C.B. and Saez J.C.** Ca<sup>2+</sup> waves are organized among hepatocytes in the intact organ. *Am J Physiol*. 1995, 269(1 Pt 1): G167-71.
- Nicco C., Wittner M., DiStefano A., Jounier S., Bankir L. and Bouby N.** Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension*. 2001, 38(5): 1143-9.
- Nielsen S., Chou C.L., Marples D., Christensen E.I., Kishore B.K. and Knepper M.A.** Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92(4): 1013-7.
- Nijima A.** Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig. *Science*. 1969, 166(3912): 1519-20.
- Nishioka N., Hirai S., Mizuno K., Osada S., Suzuki A., Kosaka K. and Ohno S.** Wortmannin inhibits the activation of MAP kinase following vasopressin V1 receptor stimulation. *FEBS Lett*. 1995, 377(3): 393-8.
- Nonoguchi H., Owada A., Kobayashi N., Takayama M., Terada Y., Koike J., Ujiie K., Marumo F., Sakai T. and Tomita K.** Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. *J Clin Invest*. 1995, 96(4): 1768-78.
- Nordlie R.C., Foster J.D. and Lange A.J.** Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr*. 1999, 19: 379-406.
- Nussdorfer G.G.** Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev*. 1996, 48(4): 495-530.
- O'Carroll A.M., Don A.L. and Lolait S.J.** APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *J Neuroendocrinol*. 2003, 15(11): 1095-101.
- Oakley R.H., Laporte S.A., Holt J.A., Barak L.S. and Caron M.G.** Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*. 1999, 274(45): 32248-57.

- Ohoka N., Yoshii S., Hattori T., Onozaki K. and Hayashi H.** TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *Embo J.* 2005, 24(6): 1243-55.
- Oikawa R., Nasa Y., Ishii R., Kuwaki T., Tanoue A., Tsujimoto G. and Takeo S.** Vasopressin V1A receptor enhances baroreflex via the central component of the reflex arc. *Eur J Pharmacol.* 2007, 558(1-3): 144-50.
- Oikawa R., Hosoda C., Nasa Y., Daicho T., Tanoue A., Tsujimoto G., Takagi N., Tanonaka K. and Takeo S.** Decreased susceptibility to salt-induced hypertension in subtotally nephrectomized mice lacking the vasopressin V1a receptor. *Cardiovasc Res.* 2010, 87(1): 187-94.
- Okar D.A. and Lange A.J.** Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors.* 1999, 10(1): 1-14.
- Orcel H., Tobin V.A., Alonso G. and Rabie A.** Immunocytochemical localization of vasopressin v1a receptors in the rat pituitary gonadotropes. *Endocrinology.* 2002, 143(11): 4385-8.
- Oshikawa S., Tanoue A., Koshimizu T.A., Kitagawa Y. and Tsujimoto G.** Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol.* 2004, 65(3): 623-9.
- Ostrowski N.L., Young W.S., 3rd, Knepper M.A. and Lolait S.J.** Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. *Endocrinology.* 1993, 133(4): 1849-59.
- Ozcan U., Cao Q., Yilmaz E., Lee A.H., Iwakoshi N.N., Ozdelen E., Tuncman G., Gorgun C., Glimcher L.H. and Hotamisligil G.S.** Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004, 306(5695): 457-61.
- Paolisso G., Tataranni P.A., Foley J.E., Bogardus C., Howard B.V. and Ravussin E.** A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia.* 1995, 38(10): 1213-7.
- Peckett A.J., Wright D.C. and Riddell M.C.** The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism.* 2011, 60(11): 1500-10.
- Pena A., Murat B., Trueba M., Ventura M.A., Bertrand G., Cheng L.L., Stoev S., Szeto H.H., Wo N., Brossard G., Serradeil-Le Gal C., Manning M. and Guillon G.** Pharmacological and physiological characterization of d[Leu4, Lys8]vasopressin, the first V1b-selective agonist for rat vasopressin/oxytocin receptors. *Endocrinology.* 2007a, 148(9): 4136-46.
- Pena A., Murat B., Trueba M., Ventura M.A., Wo N.C., Szeto H.H., Cheng L.L., Stoev S., Guillon G. and Manning M.** Design and synthesis of the first selective agonists for the rat vasopressin V(1b) receptor: based on modifications of deamino-[Cys1]arginine vasopressin at positions 4 and 8. *J Med Chem.* 2007b, 50(4): 835-47.
- Penicaud L., Ferre P., Terretaz J., Kinebanyan M.F., Leturque A., Dore E., Girard J., Jeanrenaud B. and Picon L.** Development of obesity in Zucker rats. Early insulin resistance in muscles but normal sensitivity in white adipose tissue. *Diabetes.* 1987, 36(5): 626-31.
- Perks A.M., Kindler P.M., Marshall J., Woods B., Craddock M. and Vonder Muhll I.** Lung liquid production by in vitro lungs from fetal guinea pigs: effects of arginine vasopressin and arginine vasotocin. *J Dev Physiol.* 1993, 19(5): 203-12.
- Perraudin V., Delarue C., Lefebvre H., Contesse V., Kuhn J.M. and Vaudry H.** Vasopressin stimulates cortisol secretion from human adrenocortical tissue through activation of V1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993, 76(6): 1522-8.

- Perraudin V., Delarue C., Lefebvre H., Do Rego J.L., Vaudry H. and Kuhn J.M.** Evidence for a role of vasopressin in the control of aldosterone secretion in primary aldosteronism: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(4): 1566-72.
- Perucca J., Bouby N., Valeix P., Jungers P. and Bankir L.** [Difference in urine concentration according to gender and ethnicity: possible involvement in the different susceptibility to various renal and cardiovascular diseases]. *Nephrol Ther.* 2008a, 4(3): 160-72.
- Perucca J., Bichet D.G., Bardoux P., Bouby N. and Bankir L.** Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. *J Am Soc Nephrol.* 2008b, 19(9): 1721-1731.
- Phillips P.A., Risvanis J., Hutchins A.M., Burrell L.M., MacGregor D., Gundlach A.L. and Johnston C.I.** Down-regulation of vasopressin V1a receptor mRNA in diabetes mellitus in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1995, 88(6): 671-4.
- Picard F., Richard D., Huang Q. and Deshaies Y.** Effects of leptin adipose tissue lipoprotein lipase in the obese ob/ob mouse. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998, 22(11): 1088-95.
- Pillot B., Soty M., Gautier-Stein A., Zitoun C. and Mithieux G.** Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology.* 2009, 150(2): 616-24.
- Pittel Z. and Wess J.** Intramolecular interactions in muscarinic acetylcholine receptors studied with chimeric m2/m5 receptors. *Mol Pharmacol.* 1994, 45(1): 61-4.
- Powell D.J., Turban S., Gray A., Hajdуч E. and Hundal H.S.** Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C $\zeta$  activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2004, 382 (Pt 2): 619-29.
- Preibisz J.J., Sealey J.E., Laragh J.H., Cody R.J. and Weksler B.B.** Plasma and platelet vasopressin in essential hypertension and congestive heart failure. *Hypertension.* 1983, 5(2 Pt 2): 1129-38.
- Preitner F., Bonny O., Laverriere A., Rotman S., Firsov D., Da Costa A., Metref S. and Thorens B.** Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106(36): 15501-6.
- Printz R.L., Magnuson M.A. and Granner D.K.** Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr.* 1993, 13: 463-96.
- Qi L., Saberi M., Zmuda E., Wang Y., Altarejos J., Zhang X., Dentin R., Hedrick S., Bandyopadhyay G., Hai T., Olefsky J. and Montminy M.** Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metab.* 2009, 9(3): 277-86.
- Rajas F., Croset M., Zitoun C., Montano S. and Mithieux G.** Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes.* 2000, 49(7): 1165-8.
- Ravid R., Oosterbaan H.P., Hansen B.L. and Swaab D.F.** Localisation of oxytocin, vasopressin and parts of precursors in the human neonatal adrenal. *Histochemistry.* 1986, 84(4-6): 401-7.
- Reaux A., De Mota N., Skultetyova I., Lenkei Z., El Messari S., Gallatz K., Corvol P., Palkovits M. and Llorens-Cortes C.** Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem.* 2001, 77(4): 1085-96.
- Reaux-Le Goazigo A., Bodineau L., De Mota N., Jeandel L., Chartrel N., Knauf C., Raad C., Valet P. and Llorens-Cortes C.** Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011, 301(5): E955-66.

- Rena G., Guo S., Cichy S.C., Unterman T.G. and Cohen P.** Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem.* 1999, 274(24): 17179-83.
- Rene P., Lenne F., Ventura M.A., Bertagna X. and de Keyzer Y.** Nucleotide sequence and structural organization of the human vasopressin pituitary receptor (V3) gene. *Gene.* 2000, 241(1): 57-64.
- Repaske D.R., Summar M.L., Krishnamani M.R., Gultekin E.K., Arriazu M.C., Roubicek M.E., Blanco M., Isaac G.B. and Phillips J.A., 3rd.** Recurrent mutations in the vasopressin-neurophysin II gene cause autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81(6): 2328-34.
- Rhoads D.B.** Liver GLUT-1 expression: an enigma deepens. *Hepatology.* 1994, 19(2): 540-2.
- Richmond C.A.** The role of arginine vasopressin in thermoregulation during fever. *J Neurosci Nurs.* 2003, 35(5): 281-6.
- Roach P.J.** Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *Faseb J.* 1990, 4(12): 2961-8.
- Robert J., Clauser E., Petit P.X. and Ventura M.A.** A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2005, 280(3): 2300-8.
- Roberts E.M., Pope G.R., Newson M.J., Landgraf R., Lolait S.J. and O'Carroll A.M.** Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol.* 2010, 22(4): 301-8.
- Roberts E.M., Pope G.R., Newson M.J., Lolait S.J. and O'Carroll A.M.** The vasopressin V1b receptor modulates plasma corticosterone responses to dehydration-induced stress. *J Neuroendocrinol.* 2011, 23(1): 12-9.
- Robertson G.L., Mahr E.A., Athar S. and Sinha T.** Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. *J Clin Invest.* 1973, 52(9): 2340-52.
- Robertson G.L.** The regulation of vasopressin function in health and disease. *Recent Prog Horm Res.* 1976, 33: 333-85.
- Robertson G.L.** Abnormalities of thirst regulation. *Kidney Int.* 1984, 25(2): 460-9.
- Rofe A.M. and Williamson D.H.** Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J.* 1983, 212(1): 231-9.
- Ron D. and Walter P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(7): 519-29.
- Roper J.A., Craighead M., O'Carroll A.M. and Lolait S.J.** Attenuated stress response to acute restraint and forced swimming stress in arginine vasopressin 1b receptor subtype (Avpr1b) receptor knockout mice and wild-type mice treated with a novel Avpr1b receptor antagonist. *J Neuroendocrinol.* 2010, 22(11): 1173-80.
- Roper J., O'Carroll A.M., Young W., 3rd and Lolait S.** The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress.* 2011, 14(1): 98-115.
- Roth J., Zeisberger E., Vybiral S. and Jansky L.** Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. *Front Biosci.* 2004, 9: 816-26.
- Rousseau-Merck M.F., Rene P., Derre J., Bienvenu T., Berger R. and de Keyzer Y.** Chromosomal localization of the human V3 pituitary vasopressin receptor gene (AVPR3) to 1q32. *Genomics.* 1995, 30(2): 405-6.
- Roussel R., Fezeu L., Bouby N., Balkau B., Lantieri O., Alhenc-Gelas F., Marre M. and Bankir L.** Low water intake and risk for new-onset hyperglycemia. *Diabetes Care.* 2011, 34(12): 2551-4.

- Roussel R., Hadjadj S., Pasquet B., Wilson P.W., Smith S.C., Jr., Goto S., Tubach F., Marre M., Porath A., Krempf M., Bhatt D.L. and Steg P.G.** Thiazolidinedione use is not associated with worse cardiovascular outcomes: a study in 28,332 high risk patients with diabetes in routine clinical practice: brief title: thiazolidinedione use and mortality. *Int J Cardiol.* 2012, 167(4): 1380-4.
- Rowe J.W., Shelton R.L., Helderman J.H., Vestal R.E. and Robertson G.L.** Influence of the emetic reflex on vasopressin release in man. *Kidney Int.* 1979, 16(6): 729-35.
- Sadeghi H.M., Innamorati G., Dagarag M. and Birnbaumer M.** Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol Pharmacol.* 1997, 52(1): 21-9.
- Saito M., Sugimoto T., Tahara A. and Kawashima H.** Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 212(3): 751-7.
- Saleem U., Khaleghi M., Morgenthaler N.G., Bergmann A., Struck J., Mosley T.H., Jr. and Kullo I.J.** Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009, 94(7): 2558-64.
- Salmeen A., Andersen J.N., Myers M.P., Tonks N.K. and Barford D.** Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell.* 2000, 6(6): 1401-12.
- Saltiel A.R. and Kahn C.R.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001, 414(6865): 799-806.
- Samuel V.T.** Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 22(2): 60-5.
- Sands J.M., Blount M.A. and Klein J.D.** Regulation of renal urea transport by vasopressin. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2011, 122: 82-92.
- Satin L.S., Tavalin S.J. and Smolen P.D.** Inactivation of HIT cell Ca<sup>2+</sup> current by a simulated burst of Ca<sup>2+</sup> action potentials. *Biophys J.* 1994, 66(1): 141-8.
- Sato K., Crofton J.T., Wang Y.X. and Share L.** Effects of gender on the central actions of neuropeptide Y and norepinephrine on vasopressin and blood pressure in the rat. *Brain Res.* 1995, 689(1): 71-8.
- Saxena R., Voight B.F., Lyssenko V., Burt N.P., de Bakker P.I., Chen H., Roix J.J., Kathiresan S., Hirschhorn J.N., Daly M.J., Hughes T.E., Groop L., Altshuler D., Almgren P., Florez J.C., Meyer J., Ardlie K., Bengtsson Bostrom K., Isomaa B., Lettre G., Lindblad U., Lyon H.N., Melander O., Newton-Cheh C., Nilsson P., Orho-Melander M., Rastam L., Speliotes E.K., Taskinen M.R., Tuomi T., Guiducci C., Berglund A., Carlson J., Gianniny L., Hackett R., Hall L., Holmkvist J., Laurila E., Sjogren M., Sterner M., Surti A., Svensson M., Tewhey R., Blumenstiel B., Parkin M., Defelice M., Barry R., Brodeur W., Camarata J., Chia N., Fava M., Gibbons J., Handsaker B., Healy C., Nguyen K., Gates C., Sougnez C., Gage D., Nizzari M., Gabriel S.B., Chirn G.W., Ma Q., Parikh H., Richardson D., Ricke D. and Purcell S.** Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science.* 2007, 316(5829): 1331-6.
- Schafer J.A. and Troutman S.L.** cAMP mediates the increase in apical membrane Na<sup>+</sup> conductance produced in rat CCD by vasopressin. *Am J Physiol.* 1990, 259(5 Pt 2): F823-31.
- Scheuer D.A. and Bishop V.S.** Effect of vasopressin on baroreflex control of lumbar sympathetic nerve activity and hindquarter resistance. *Am J Physiol.* 1996, 270 (6 Pt 2): H1963-71.

- Schillinger E., Loge O., Schroder E., Klieger E. and Lubke K.** Structure activity relationship of the insulin-like effects of the neurohypophysial peptide hormones. *Eur J Biochem.* 1972, 27(3): 473-81.
- Schiltz J.C., Hoffman G.E., Stricker E.M. and Sved A.F.** Decreases in arterial pressure activate oxytocin neurons in conscious rats. *Am J Physiol.* 1997, 273(4 Pt 2): R1474-83.
- Schmidt A., Audigier S., Barberis C., Jard S., Manning M., Kolodziejczyk A.S. and Sawyer W.H.** A radioiodinated linear vasopressin antagonist: a ligand with high affinity and specificity for V1a receptors. *FEBS Lett.* 1991, 282(1): 77-81.
- Schmidt S., Joost H.G. and Schurmann A.** GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 296(4): E614-8.
- Schmitz-Peiffer C., Browne C.L., Oakes N.D., Watkinson A., Chisholm D.J., Kraegen E.W. and Biden T.J.** Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes.* 1997, 46(2): 169-78.
- Schmitz-Peiffer C. and Biden T.J.** Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes.* 2008, 57(7): 1774-83.
- Schrag J.D., Procopio D.O., Cygler M., Thomas D.Y. and Bergeron J.J.** Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci.* 2003, 28(1): 49-57.
- Schreihöfer A.M., Hoffman G.E. and Sved A.F.** The kidneys stimulate vasopressin release during hemorrhage in rats with chronic NTS lesions. *Am J Physiol.* 1997, 272 (5 Pt 2): R1540-51.
- Seibold A., Brabet P., Rosenthal W. and Birnbaumer M.** Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene. *Am J Hum Genet.* 1992, 51(5): 1078-83.
- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Garcia C., Lacour C., Guiraudou P., Christophe B., Villanova G., Nisato D., Maffrand J.P., Le Fur G. and et al.** Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V1a receptors. *J Clin Invest.* 1993, 92(1): 224-31.
- Serradeil-Le Gal C., Bourrie B., Raufaste D., Carayon P., Garcia C., Maffrand J.P., Le Fur G. and Casellas P.** Effect of a new, potent, non-peptide V1a vasopressin antagonist, SR 49059, on the binding and the mitogenic activity of vasopressin on Swiss 3T3 cells. *Biochem Pharmacol.* 1994, 47(4): 633-41.
- Serradeil-Le Gal C., Raufaste D., Marty E., Garcia C., Maffrand J.P. and Le Fur G.** Autoradiographic localization of vasopressin V1a receptors in the rat kidney using [3H]-SR 49059. *Kidney Int.* 1996, 50(2): 499-505.
- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Valette G., Garcia G., Pascal M., Maffrand J.P. and Le Fur G.** Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog Brain Res.* 2002a, 139: 197-210.
- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Simiand J., Griebel G., Lacour C., Guillon G., Barberis C., Brossard G., Soubrie P., Nisato D., Pascal M., Pruss R., Scatton B., Maffrand J.P. and Le Fur G.** Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002b, 300(3): 1122-30.

- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., 3rd, Tonnerre B., Roux R., Garcia G., Griebel G. and Aulombard A.** An overview of SSR149415, a selective nonpeptide vasopressin V(1b) receptor antagonist for the treatment of stress-related disorders. *CNS Drug Rev.* 2005, 11(1): 53-68.
- Serradeil-Le Gal C., Raufaste D., Derick S., Blankenstein J., Allen J., Pouzet B., Pascal M., Wagnon J. and Ventura M.A.** Biological characterization of rodent and human vasopressin V1b receptors using SSR-149415, a nonpeptide V1b receptor ligand. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007, 293(2): R938-49.
- Serriere V., Berthon B., Boucherie S., Jacquemin E., Guillon G., Claret M. and Tordjmann T.** Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow. *Faseb J.* 2001, 15(8): 1484-6.
- Seyler L.E., Jr., Pomerleau O.F., Fertig J.B., Hunt D. and Parker K.** Pituitary hormone response to cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986, 24(1): 159-62.
- Share L.** Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 1988, 68(4): 1248-84.
- Shepherd P.R., Gibbs E.M., Wesslau C., Gould G.W. and Kahn B.B.** Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes.* 1992, 41(10): 1360-5.
- Sherwin R.S., Anderson R.M., Buse J.B., Chin M.H., Eddy D., Fradkin J., Ganiats T.G., Ginsberg H.N., Kahn R., Nwankwo R., Rewers M., Schlessinger L., Stern M., Vinicor F. and Zinman B.** Prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004, 27 (Suppl 1): S47-54.
- Shimazu T. and Ogasawara S.** Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am J Physiol.* 1975, 228(6): 1787-93.
- Shimazu T. and Amakawa A.** Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. VI. Possible mechanism of phosphorylase activation by the splanchnic nerve. *Biochim Biophys Acta.* 1975, 385(2): 242-56.
- Shimazu T.** Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia.* 1981, 20(3): 343-56.
- Shimomura I., Hammer R.E., Ikemoto S., Brown M.S. and Goldstein J.L.** Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature.* 1999, 401(6748): 73-6.
- Simpson I.A., Dwyer D., Malide D., Moley K.H., Travis A. and Vannucci S.J.** The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, 295(2): E242-53.
- Sladek R., Rocheleau G., Rung J., Dina C., Shen L., Serre D., Boutin P., Vincent D., Belisle A., Hadjadj S., Balkau B., Heude B., Charpentier G., Hudson T.J., Montpetit A., Pshezhetsky A.V., Prentki M., Posner B.I., Balding D.J., Meyre D., Polychronakos C. and Froguel P.** A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007, 445(7130): 881-5.
- Sokol H.W., Zimmerman E.A., Sawyer W.H. and Robinson A.G.** The hypothalamic-neurohypophysial system of the rat: localization and quantitation of neurophysin by light microscopic immunocytochemistry in normal rats and in Brattleboro rats deficient in vasopressin and a neurophysin. *Endocrinology.* 1976, 98(5): 1176-88.
- Sorensen P.S. and Hammer M.** Vasopressin in plasma and ventricular cerebrospinal fluid during dehydration, postural changes, and nausea. *Am J Physiol.* 1985, 248(1 Pt 2): R78-83.

- Sparks J.D., Phung T.L., Bolognino M., Cianci J., Khurana R., Peterson R.G., Sowden M.P., Corsetti J.P. and Sparks C.E.** Lipoprotein alterations in 10- and 20-week-old Zucker diabetic fatty rats: hyperinsulinemic versus insulinopenic hyperglycemia. *Metabolism*. 1998, 47(11): 1315-24.
- Spiga F., Harrison L.R., MacSweeney C.P., Thomson F.J., Craighead M. and Lightman S.L.** Effect of vasopressin 1b receptor blockade on the hypothalamic-pituitary-adrenal response of chronically stressed rats to a heterotypic stressor. *J Endocrinol*. 2009, 200(3): 285-91.
- Spruce B.A., McCulloch A.J., Burd J., Orskov H., Heaton A., Baylis P.H. and Alberti K.G.** The effect of vasopressin infusion on glucose metabolism in man. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1985, 22(4): 463-8.
- Stachenfeld N.S., Splenser A.E., Calzone W.L., Taylor M.P. and Keefe D.L.** Sex differences in osmotic regulation of AVP and renal sodium handling. *J Appl Physiol (1985)*. 2001, 91(4): 1893-901.
- Staddon J.M. and McGivan J.D.** Distinct effects of glucagon and vasopressin on proline metabolism in isolated hepatocytes. The role of oxoglutarate dehydrogenase. *Biochem J*. 1984, 217(2): 477-83.
- Staddon J.M. and McGivan J.D.** Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of oxoglutarate dehydrogenase by vasopressin in isolated hepatocytes. *Biochem J*. 1985, 225(2): 327-33.
- Stafford J.M., Wilkinson J.C., Beechem J.M. and Granner D.K.** Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem*. 2001, 276(43): 39885-91.
- Strakova Z., Kumar A., Watson A.J. and Soloff M.S.** A new linear V1A vasopressin antagonist and its use in characterizing receptor/G protein interactions. *Mol Pharmacol*. 1997, 51(2): 217-24.
- Stricker E.M.** Extracellular fluid volume and thirst. *Am J Physiol*. 1966, 211(1): 232-8.
- Stricker E.M. and Sved A.F.** Controls of vasopressin secretion and thirst: similarities and dissimilarities in signals. *Physiol Behav*. 2002, 77(4-5): 731-6.
- Stubbs M., Kirk C.J. and Hems D.A.** Role of extracellular calcium in the action of vasopressin on hepatic glycogenolysis. *FEBS Lett*. 1976, 69(1): 199-202.
- Stumpf B., Boie A. and Seubert W.** In vitro stimulation of gluconeogenesis from pyruvate and of 14 CO<sub>2</sub> -fixation by dexamethasone phosphate and vasopressin in the kidney cortex of adrenalectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972, 49(1): 164-70.
- Stumvoll M., Chintalapudi U., Perriello G., Welle S., Gutierrez O. and Gerich J.** Uptake and release of glucose by the human kidney. Postabsorptive rates and responses to epinephrine. *J Clin Invest*. 1995, 96(5): 2528-33.
- Sugimoto T., Saito M., Mochizuki S., Watanabe Y., Hashimoto S. and Kawashima H.** Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem*. 1994, 269(43): 27088-92.
- Tahara A., Tsukada J., Tomura Y., Yatsu T. and Shibasaki M.** Downregulation of vasopressin V1A receptors and activation of mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells cultured under high-glucose conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012, 39(5): 438-46.
- Takaya K., Ogawa Y., Hiraoka J., Hosoda K., Yamori Y., Nakao K. and Koletsky R.J.** Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat Genet*. 1996, 14(2): 130-1.
- Takayanagi Y., Kasahara Y., Onaka T., Takahashi N., Kawada T. and Nishimori K.** Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. *Neuroreport*. 2008, 19(9): 951-5.



- Tallroth G., Ryding E., Ekman R. and Agardh C.D.** The response of regulatory peptides to moderate hypoglycaemia of short duration in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and in normal man. *Diabetes Res.* 1992, 20(3): 73-85.
- Tang E.D., Nunez G., Barr F.G. and Guan K.L.** Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem.* 1999, 274(24): 16741-6.
- Tanoue A., Ito S., Honda K., Oshikawa S., Kitagawa Y., Koshimizu T.A., Mori T. and Tsujimoto G.** The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest.* 2004, 113(2): 302-9.
- Tanoue A.** New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: effects of vasopressin receptor on regulations of hormone secretion and metabolisms of glucose, fat, and protein. *J Pharmacol Sci.* 2009, 109(1): 50-2.
- Tanti J.F., Gremeaux T., van Obberghen E. and Le Marchand-Brustel Y.** Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem.* 1994, 269(8): 6051-7.
- Tashima Y., Kohda Y., Nonoguchi H., Ikebe M., Machida K., Star R.A. and Tomita K.** Intranephron localization and regulation of the V1a vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats. *Pflugers Arch.* 2001, 442(5): 652-61.
- Then C., Kowall B., Lechner A., Meisinger C., Heier M., Koenig W., Peters A., Rathmann W. and Seissler J.** Plasma copeptin is associated with type 2 diabetes in men but not in women in the population-based KORA F4 study. *Acta Diabetol.* 2014.
- Thibonnier M.** Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. *Regul Pept.* 1992, 38(1): 1-11.
- Thibonnier M., Auzan C., Madhun Z., Wilkins P., Berti-Mattera L. and Clauser E.** Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 1994, 269(5): 3304-10.
- Thibonnier M., Graves M.K., Wagner M.S., Auzan C., Clauser E. and Willard H.F.** Structure, sequence, expression, and chromosomal localization of the human V1a vasopressin receptor gene. *Genomics.* 1996, 31(3): 327-34.
- Thibonnier M., Preston J.A., Dulin N., Wilkins P.L., Berti-Mattera L.N. and Mattera R.** The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology.* 1997, 138(10): 4109-22.
- Thibonnier M., Coles P., Conarty D.M., Plesnicher C.L. and Shoham M.** A molecular model of agonist and nonpeptide antagonist binding to the human V(1) vascular vasopressin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000, 294(1): 195-203.
- Thorens B.** Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol.* 1992, 137: 209-38.
- Thorens B. and Mueckler M.** Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010, 298(2): E141-5.
- Thornton S.N.** Thirst and hydration: physiology and consequences of dysfunction. *Physiol Behav.* 2010, 100(1): 15-21.
- Thrasher T.N.** Osmoreceptor mediation of thirst and vasopressin secretion in the dog. *Fed Proc.* 1982, 41(9): 2528-32.
- Tilbrook A.J. and Clarke I.J.** Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front Neuroendocrinol.* 2006, 27(3): 285-307.

- Tordjmann T., Berthon B., Jacquemin E., Clair C., Stelly N., Guillon G., Claret M. and Combettes L.** Receptor-oriented intercellular calcium waves evoked by vasopressin in rat hepatocytes. *Embo J.* 1998a, 17(16): 4695-703.
- Tordjmann T., Tran D., Berthon B., Jacquemin E., Guillon G., Combettes L. and Claret M.** [Intracellular calcium channels, hormone receptors and intercellular calcium waves]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1998b, 192(1): 149-57.
- Trager K., Radermacher P., Debacker D., Vogt J., Jakob S. and Ensinger H.** Metabolic effects of vasoactive agents. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2001, 14(2): 157-63.
- Trager K. and Radermacher P.** Catecholamines in the treatment of septic shock: effects beyond perfusion. *Crit Care Resusc.* 2003, 5(4): 270-6.
- Treschan T.A. and Peters J.** The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology.* 2006, 105(3): 599-612; quiz 639-40.
- Tribollet E., Raufaste D., Maffrand J. and Serradeil-Le Gal C.** Binding of the non-peptide vasopressin V1a receptor antagonist SR-49059 in the rat brain: an in vitro and in vivo autoradiographic study. *Neuroendocrinology.* 1999, 69(2): 113-20.
- Tsai R.C., Yamaji T., Ishibashi M., Takaku F., Fu M., Cherng W.J., Inoue K. and Hung J.S.** Atrial natriuretic peptide and vasopressin during percutaneous transvenous mitral valvuloplasty and relation to renin-angiotensin-aldosterone system and renal function. *Am J Cardiol.* 1990, 65(13): 882-6.
- Tsiotra P.C. and Tsigos C.** Stress, the endoplasmic reticulum, and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1083: 63-76.
- Turinsky J., O'Sullivan D.M. and Bayly B.P.** 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990, 265(28): 16880-5.
- Ufer E., Postina R., Gorbulev V. and Fahrenholz F.** An extracellular residue determines the agonist specificity of V2 vasopressin receptors. *FEBS Lett.* 1995, 362(1): 19-23.
- Uldry M., Ibberson M., Hosokawa M. and Thorens B.** GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 2002, 524(1-3): 199-203.
- Uldry M. and Thorens B.** The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 2004, 447(5): 480-9.
- Uyama N., Geerts A. and Reynaert H.** Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004, 280(1): 808-20.
- Vahl T.P., Ulrich-Lai Y.M., Ostrander M.M., Dolgas C.M., Elfers E.E., Seeley R.J., D'Alessio D.A. and Herman J.P.** Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005, 289(5): E823-8.
- Vale W., Spiess J., Rivier C. and Rivier J.** Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science.* 1981, 213(4514): 1394-7.
- van de Werve G., Hue L. and Hers H.G.** Hormonal and ionic control of the glycogenolytic cascade in rat liver. *Biochem J.* 1977, 162(1): 135-42.
- van de Werve G. and Massillon D.** Altered regulation of glycogen metabolism by vasopressin and phenylephrine in hepatocytes from insulin-resistant obese (fa/fa) rats. Role of protein kinase C. *Biochem J.* 1990, 269(3): 795-9.
- van Itallie C.M. and Fernstrom J.D.** Osmolal effects on vasopressin secretion in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol.* 1982, 242(6): E411-7.
- van Leeuwen F.W., de Raay C., Swaab D.F. and Fisser B.** The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat neurohypophysis. *Cell Tissue Res.* 1979, 202(2): 189-201.

- van Lieburg A.F., Knoers N.V., Monnens L.A. and Smits P.** Effects of arginine vasopressin and 1-desamino-8-D arginine vasopressin on forearm vasculature of healthy subjects and patients with a V2 receptor defect. *J Hypertens.* 1995, 13 (12 Pt 2): 1695-700.
- van Obberghen E., Baron V., Delahaye L., Emanuelli B., Filippa N., Giorgetti-Peraldi S., Lebrun P., Mothe-Satney I., Peraldi P., Rocchi S., Sawka-Verhelle D., Tartare-Deckert S. and Giudicelli J.** Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest.* 2001, 31(11): 966-77.
- van Zwieten P.A.** Compensatory changes of sympathetic tone, the renin-angiotensin-aldosterone system, vasopressin, and ANF as potential therapeutic targets in congestive heart failure. *Z Kardiol.* 1988, 77 (Suppl 5): 67-76.
- Vandesande F., Dierickx K. and De Mey J.** The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.* 1977, 180(4): 443-52.
- Velho G., Byrne M.M., Clement K., Sturis J., Pueyo M.E., Blanche H., Vionnet N., Fiet J., Passa P., Robert J.J., Polonsky K.S. and Froguel P.** Clinical phenotypes, insulin secretion, and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene mutation. *Diabetes.* 1996, 45(4): 478-87.
- Velho G., Bouby N., Hadjadj S., Matallah N., Mohammedi K., Fumeron F., Potier L., Bellili-Munoz N., Taveau C., Alhenc-Gelas F., Bankir L., Marre M. and Roussel R.** Plasma copeptin and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabetes Care.* 2013, 36(11): 3639-45.
- Verney E.B.** The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1947, 135(878): 25-106.
- Voight B.F., Scott L.J., Steinthorsdottir V., Morris A.P., Dina C., Welch R.P., Zeggini E., Huth C., Aulchenko Y.S., Thorleifsson G., McCulloch L.J., Ferreira T., Grallert H., Amin N., Wu G., Willer C.J., Raychaudhuri S., McCarroll S.A., Langenberg C., Hofmann O.M., Dupuis J., Qi L., Segre A.V., van Hoek M., Navarro P., Ardlie K., Balkau B., Benediktsson R., Bennett A.J., Blagieva R., Boerwinkle E., Bonnycastle L.L., Bengtsson Bostrom K., Bravenboer B., Bumpstead S., Burt N.P., Charpentier G., Chines P.S., Cornelis M., Couper D.J., Crawford G., Doney A.S., Elliott K.S., Elliott A.L., Erdos M.R., Fox C.S., Franklin C.S., Ganser M., Gieger C., Grarup N., Green T., Griffin S., Groves C.J., Guiducci C., Hadjadj S., Hassanali N., Herder C., Isomaa B., Jackson A.U., Johnson P.R., Jorgensen T., Kao W.H., Klopp N., Kong A., Kraft P., Kuusisto J., Lauritzen T., Li M., Lieveise A., Lindgren C.M., Lyssenko V., Marre M., Meitinger T., Midtjell K., Morken M.A., Narisu N., Nilsson P., Owen K.R., Payne F., Perry J.R., Petersen A.K., Platou C., Proenca C., Prokopenko I., Rathmann W., Rayner N.W., Robertson N.R., Rocheleau G., Roden M., Sampson M.J., Saxena R., Shields B.M., Shrader P., Sigurdsson G., Sparso T., Strassburger K., Stringham H.M., Sun Q., Swift A.J., Thorand B., Tichet J., Tuomi T., van Dam R.M., van Haeften T.W., van Herpt T., van Vliet-Ostaptchouk J.V., Walters G.B., Weedon M.N., Wijmenga C., Witteman J., Bergman R.N., Cauchi S., Collins F.S., Gloyn A.L., Gyllenstein U., Hansen T., Hide W.A., Hitman G.A., Hofman A., Hunter D.J., Hveem K., Laakso M., Mohlke K.L., Morris A.D., Palmer C.N., Pramstaller P.P., Rudan I., Sijbrands E., Stein L.D., Tuomilehto J., Uitterlinden A., Walker M., Wareham N.J., Watanabe R.M., Abecasis G.R., Boehm B.O., Campbell H., Daly M.J., Hattersley A.T., Hu F.B., Meigs J.B., Pankow J.S., Pedersen O., Wichmann**

- H.E., Barroso I., Florez J.C., Frayling T.M., Groop L., Sladek R., Thorsteinsdottir U., Wilson J.F., Illig T., Froguel P., van Duijn C.M., Stefansson K., Altshuler D., Boehnke M. and McCarthy M.I. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet.* 2010, 42(7): 579-89.
- Wahrenberg H., Hertel K., Leijonhufvud B.M., Persson L.G., Toft E. and Arner P. Use of waist circumference to predict insulin resistance: retrospective study. *Bmj.* 2005, 330(7504): 1363-4.
- Wakelam M.J., Murphy G.J., Hruby V.J. and Houslay M.D. Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature.* 1986, 323(6083): 68-71.
- Walsh C.H., Baylis P.H. and Malins J.M. Plasma arginine vasopressin in diabetic ketoacidosis. *Diabetologia.* 1979, 16(2): 93-6.
- Wang Y.X., Edwards R.M., Nambi P., Stack E.J., Pullen M., Share L., Crofton J.T. and Brooks D.P. Sex difference in the antidiuretic activity of vasopressin in the rat. *Am J Physiol.* 1993, 265(6 Pt 2): R1284-90.
- Wang H. and Eckel R.H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009, 297(2): E271-88.
- Weinstein S.P., Wilson C.M., Pritsker A. and Cushman S.W. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism.* 1998, 47(1): 3-6.
- Wendel A.A., Li L.O., Li Y., Cline G.W., Shulman G.I. and Coleman R.A. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity. *Diabetes.* 2010, 59(6): 1321-9.
- Wenzel V., Krismer A.C., Arntz H.R., Sitter H., Stadlbauer K.H. and Lindner K.H. A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med.* 2004, 350(2): 105-13.
- White M.F. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002, 283(3): E413-22.
- Whitton P.D., Rodrigues L.M. and Hems D.A. Stimulation by vasopressin, angiotensin and oxytocin of gluconeogenesis in hepatocyte suspensions. *Biochem J.* 1978, 176(3): 893-8.
- Wideman C.H. and Murphy H.M. Modulatory effects of vasopressin on glucose and protein metabolism during food-restriction stress. *Peptides.* 1993, 14(2): 259-61.
- Wilkins J.N., Carlson H.E., Van Vunakis H., Hill M.A., Gritz E. and Jarvik M.E. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl).* 1982, 78(4): 305-8.
- Willi C., Bodenmann P., Ghali W.A., Faris P.D. and Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama.* 2007, 298(22): 2654-64.
- Wolfrum C., Asilmaz E., Luca E., Friedman J.M. and Stoffel M. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature.* 2004, 432(7020): 1027-32.
- Wright E.M., Loo D.D. and Hirayama B.A. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev.* 2011, 91(2): 733-94.
- Wu C., Okar D.A., Stoeckman A.K., Peng L.J., Herrera A.H., Herrera J.E., Towle H.C. and Lange A.J. A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology.* 2004, 145(2): 650-8.

- Yamamura Y., Ogawa H., Chihara T., Kondo K., Onogawa T., Nakamura S., Mori T., Tominaga M. and Yabuuchi Y.** OPC-21268, an orally effective, nonpeptide vasopressin V1 receptor antagonist. *Science*. 1991, 252(5005): 572-4.
- Yasui M., Zelenin S.M., Celsi G. and Aperia A.** Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am J Physiol*. 1997, 272(4 Pt 2): F443-50.
- Yasuoka Y., Kobayashi M., Sato Y., Nonoguchi H., Tanoue A., Okamoto H. and Kawahara K.** Decreased expression of aquaporin 2 in the collecting duct of mice lacking the vasopressin V1a receptor. *Clin Exp Nephrol*. 2013, 17(2): 183-90.
- Yazawa H., Hirasawa A., Horie K., Saita Y., Iida E., Honda K. and Tsujimoto G.** Oxytocin receptors expressed and coupled to Ca<sup>2+</sup> signalling in a human vascular smooth muscle cell line. *Br J Pharmacol*. 1996, 117(5): 799-804.
- Yibchok-Anun S. and Hsu W.H.** Effects of arginine vasopressin and oxytocin on glucagon release from clonal alpha-cell line In-R1-G9: involvement of V1b receptors. *Life Sci*. 1998, 63(21): 1871-8.
- Yibchok-Anun S., Cheng H., Heine P.A. and Hsu W.H.** Characterization of receptors mediating AVP- and OT-induced glucagon release from the rat pancreas. *Am J Physiol*. 1999, 277(1 Pt 1): E56-62.
- Yibchok-Anun S., Cheng H., Chen T.H. and Hsu W.H.** Mechanisms of AVP-induced glucagon release in clonal alpha-cells in-R1-G9: involvement of Ca(2+)-dependent and -independent pathways. *Br J Pharmacol*. 2000, 129(2): 257-64.
- Yibchok-Anun S., Abu-Basha E.A., Yao C.Y., Panichkriangkrai W. and Hsu W.H.** The role of arginine vasopressin in diabetes-associated increase in glucagon secretion. *Regul Pept*. 2004, 122(3): 157-62.
- Yip K.P.** Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006, 291(4): F882-90.
- Young A.A., Cooper G.J., Carlo P., Rink T.J. and Wang M.W.** Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. *Am J Physiol*. 1993, 264(6 Pt 1): E943-50.
- Yu C., Chen Y., Cline G.W., Zhang D., Zong H., Wang Y., Bergeron R., Kim J.K., Cushman S.W., Cooney G.J., Atcheson B., White M.F., Kraegen E.W. and Shulman G.I.** Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem*. 2002, 277(52): 50230-6.
- Yue P., Jin H., Aillaud M., Deng A.C., Azuma J., Asagami T., Kundu R.K., Reaven G.M., Quertermous T. and Tsao P.S.** Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010, 298(1): E59-67.
- Zambotti-Villela L., Yamasaki S.C., Villarroel J.S., Alponi R.F. and Silveira P.F.** Aspartyl, arginyl and alanyl aminopeptidase activities in the hippocampus and hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res*. 2007, 1170: 112-8.
- Zeggini E., Weedon M.N., Lindgren C.M., Frayling T.M., Elliott K.S., Lango H., Timpson N.J., Perry J.R., Rayner N.W., Freathy R.M., Barrett J.C., Shields B., Morris A.P., Ellard S., Groves C.J., Harries L.W., Marchini J.L., Owen K.R., Knight B., Cardon L.R., Walker M., Hitman G.A., Morris A.D., Doney A.S., McCarthy M.I. and Hattersley A.T.** Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*. 2007, 316(5829): 1336-41.

- Zeggini E., Scott L.J., Saxena R., Voight B.F., Marchini J.L., Hu T., de Bakker P.I., Abecasis G.R., Almgren P., Andersen G., Ardlie K., Bostrom K.B., Bergman R.N., Bonnycastle L.L., Borch-Johnsen K., Burt N.P., Chen H., Chines P.S., Daly M.J., Deodhar P., Ding C.J., Doney A.S., Duren W.L., Elliott K.S., Erdos M.R., Frayling T.M., Freathy R.M., Gianniny L., Grallert H., Grarup N., Groves C.J., Guiducci C., Hansen T., Herder C., Hitman G.A., Hughes T.E., Isomaa B., Jackson A.U., Jorgensen T., Kong A., Kubalanza K., Kuruvilla F.G., Kuusisto J., Langenberg C., Lango H., Lauritzen T., Li Y., Lindgren C.M., Lyssenko V., Marvelle A.F., Meisinger C., Midthjell K., Mohlke K.L., Morken M.A., Morris A.D., Narisu N., Nilsson P., Owen K.R., Palmer C.N., Payne F., Perry J.R., Pettersen E., Platou C., Prokopenko I., Qi L., Qin L., Rayner N.W., Rees M., Roix J.J., Sandbaek A., Shields B., Sjogren M., Steinthorsdottir V., Stringham H.M., Swift A.J., Thorleifsson G., Thorsteinsdottir U., Timpson N.J., Tuomi T., Tuomilehto J., Walker M., Watanabe R.M., Weedon M.N., Willer C.J., Illig T., Hveem K., Hu F.B., Laakso M., Stefansson K., Pedersen O., Wareham N.J., Barroso I., Hattersley A.T., Collins F.S., Groop L., McCarthy M.I., Boehnke M. and Altshuler D.** Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2008, 40(5): 638-45.
- Zelena D., Langnaese K., Domokos A., Pinter O., Landgraf R., Makara G.B. and Engelmann M.** Vasopressin administration into the paraventricular nucleus normalizes plasma oxytocin and corticosterone levels in Brattleboro rats. *Endocrinology.* 2009, 150(6): 2791-8.
- Zerbe R.L., Vinicor F. and Robertson G.L.** Plasma vasopressin in uncontrolled diabetes mellitus. *Diabetes.* 1979, 28(5): 503-8.
- Zhao F.Q. and Keating A.F.** Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* 2007, 8(2): 113-28.
- Zhu X., Gilbert S., Birnbaumer M. and Birnbaumer L.** Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol.* 1994, 46(3): 460-9.
- Zierath J.R., He L., Guma A., Odegaard Wahlstrom E., Klip A. and Wallberg-Henriksson H.** Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1996, 39(10): 1180-9.
- Zisman A., Peroni O.D., Abel E.D., Michael M.D., Mauvais-Jarvis F., Lowell B.B., Wojtaszewski J.F., Hirshman M.F., Virkamaki A., Goodyear L.J., Kahn C.R. and Kahn B.B.** Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 2000, 6(8): 924-8.
- Zucker T.F. and Zucker L.M.** Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr.* 1963, 80 : 6-19.

# Annexes

---

## Annexe 1 : Détermination de la souche de rats Sprague-Dawley ou Wistar

### Introduction

Lorsque nous avons démarré ce projet, les travaux précédents concernant la vasopressine et le métabolisme glucidique avaient été réalisées soit sur des cultures cellulaires ou sur des organes isolés et perfusés soit *in vivo* après une injection aigüe de vasopressine. Ces études avaient été effectuées soit sur des rats Sprague-Dawley soit sur des rats Wistar mais sans justification de la souche de rats utilisée. Ainsi, nous avons entrepris une petite expérience préliminaire afin de déterminer quelle souche de rats était la plus propice à démontrer d'éventuel effet de la vasopressine sur le métabolisme glucidique.

### Matériel et méthodes

Des rats Sprague-Dawley et des rats Wistar mâles (Charles River laboratories, l'Arbresle, France) ont été étudiés. Après 2 jours d'adaptation en cage à métabolisme, les paramètres urinaires ont été mesurés sur deux périodes successives de 24 heures, avant et après déshydratation pour estimer la sécrétion et la sensibilité rénale de ces rats à la vasopressine. Une mesure de la glycémie a également été effectuée, après 6 heures de jeun, ainsi qu'un test de tolérance au glucose (1,5 g glucose.kg<sup>-1</sup> de poids corporel) afin de déterminer s'il existait une différence de stockage de glucose. La glycémie est mesurée aux temps 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'injection de glucose.

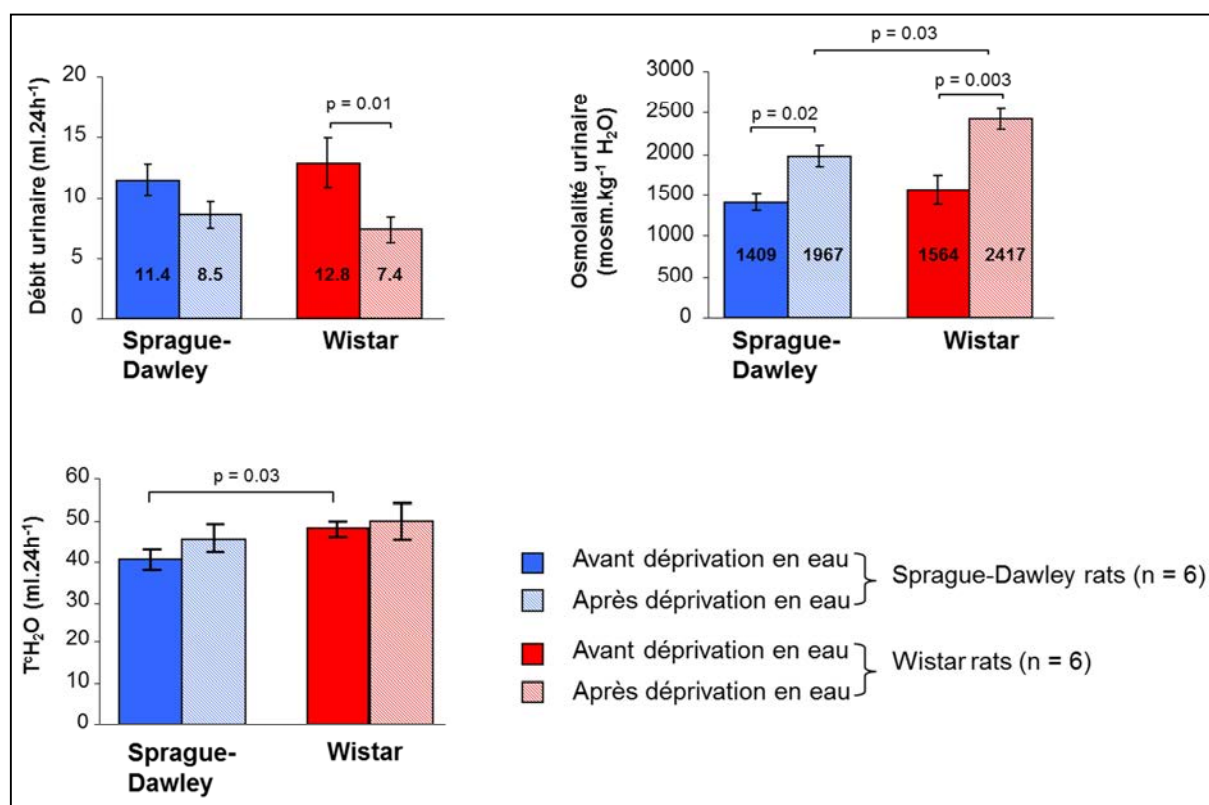
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences statistiques, entre le groupes de rats, ont été établies par un test t non-apparié de Student. La comparaison entre avant et après la déprivation en eau a été analysée par un test t apparié de Student. Le niveau de significativité choisie était de  $p < 0,05$ .

## Résultats et discussion

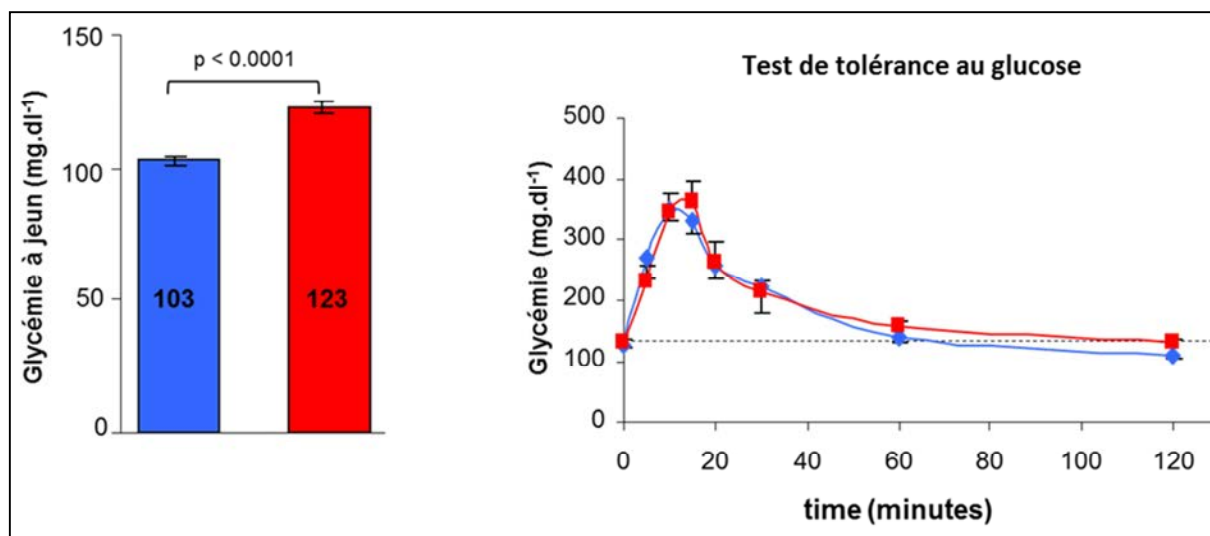
Les résultats présentés dans la figure ci-dessous montrent des valeurs de réabsorption d'eau libre plus élevées chez les rats Wistar comparés aux rats Sprague-Dawley, dans les conditions basales. La déshydratation, conduisant à une augmentation de la sécrétion vasopressinergique, a induit comme attendu une diminution du débit urinaire et une augmentation dans l'osmolalité urinaire chez les deux souches de rats. Les données sur l'osmolalité urinaire montrent que les rats Wistar atteignent des valeurs d'osmolalité urinaire significativement plus élevée que les rats Sprague-Dawley après 24 heures sans eau.

La glycémie à jeun était significativement plus élevée chez les rats Wistar que les rats Sprague-Dawley. En revanche, le test de tolérance au glucose n'a pas montré de différence dans les capacités de stockage du glucose.

A l'issu de ces résultats, nous avons choisi de travailler sur des rats Sprague-Dawley. Ceux-ci présentant la glycémie à jeun la plus faible, il nous a semblé qu'il serait peut-être plus facile de montrer un effet hyperglycémiant de la vasopressine sur cette souche.







## Annexe 2 : Détermination de la dose chronique de vasopressine

Les effets chroniques de la vasopressine sur le métabolisme glucidique, n'ayant jamais été étudiés à ce jour, le choix d'une dose efficace a été difficile. Nous avons donc décidé de nous baser sur une dose de vasopressine qui permettrait, en chronique, d'induire une augmentation de l'activité de concentration des urines sans avoir un impact sur la fonction cardiovasculaire.

### Matériel et méthodes

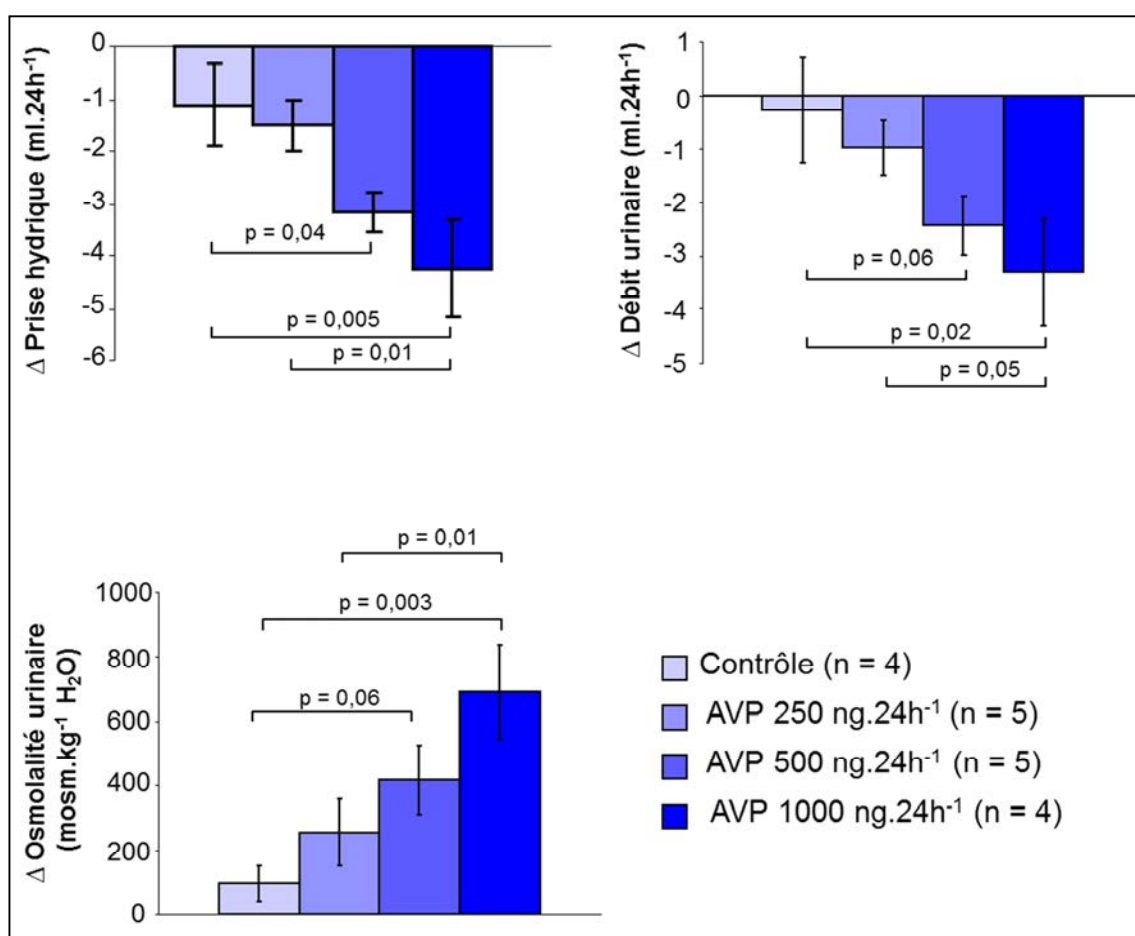
Les rats Sprague-Dawley ont été divisés en quatre groupes traités avec différentes doses de vasopressine (0, 250, 500 et 1000 ng/kg.24h<sup>-1</sup>), chroniquement pendant 2 semaines par minipompes implantés en voie intra-péritonéale. Les paramètres urinaires ont été mesurés avant et après le traitement chronique par la vasopressine sur deux périodes successives de 24 heures. Une mesure de la glycémie a également été effectuée, après 6 heures de jeun, à l'aide d'un glucomètre sur un échantillon sanguin de 2 µl. La pression artérielle a été déterminée, sur les animaux éveillés, par pléthysmographie, au cours de la deuxième semaine de traitement et sur une période de 4 jours.

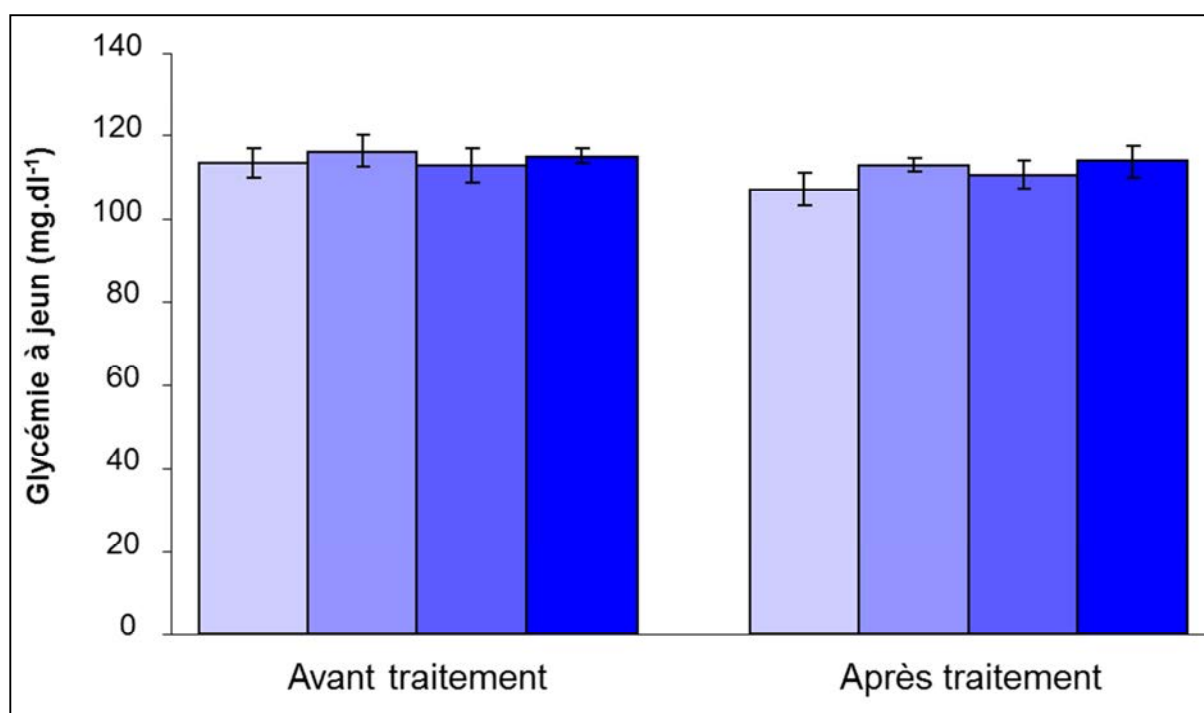
Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Afin de mieux visualiser les effets de la vasopressine, les résultats sur les paramètres urinaires correspondent à la différence entre la valeur obtenue avant traitement et la valeur obtenue après traitement. Les différences statistiques, entre les groupes de rats, ont été établies par une ANOVA à un facteur (groupe) suivie par un test *post hoc* de Fisher. Le niveau de significativité choisie était de  $p < 0,05$ .

### Résultats et discussion

L'ensemble des données a permis de montrer que le traitement chronique (2 semaines) avec la vasopressine a induit, comme attendu, une diminution de la prise hydrique et du débit urinaire ainsi qu'une augmentation dans l'activité de concentration des urines. Ces effets ont été observés dès la dose de 500 ng/kg.24h<sup>-1</sup>. Cependant, le doublement de la dose (1000 ng/kg.24h<sup>-1</sup>) n'a pas induit d'effets plus marqués par rapport à la dose de 500 ng.24h<sup>-1</sup>. Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que des doses croissantes de dDAVP (agoniste spécifique des récepteurs V2) conduisait à une augmentation de l'activité de

concentration des urines et une diminution du débit urinaire pour une dose administrée de 20 ng.kg<sup>-1</sup>. Toutefois dans cette même étude, les doses plus fortes (60 à 600 ng.kg<sup>-1</sup>) n'ont pas augmenté d'avantage l'osmolalité urinaire et inversement pour le débit urinaire. Cela témoigne que le rein est capable d'augmenter la concentration des urines par stimulation des récepteurs V2 jusqu'à un certain seuil. A savoir, la dDAVP est 10 fois plus efficace que la vasopressine sur la fonction rénale (Perruca J. et al, 2008). Dans notre étude, les doses administrées en vasopressine correspondraient théoriquement à 50 et 100 ng/kg.24h<sup>-1</sup> de dDAVP. Dès lors, l'absence d'effets plus marqués de la vasopressine, à la dose de 1000 ng/kg.24h<sup>-1</sup>, peut s'expliquer par le franchissement du seuil maximal dans l'activité de concentration des urines par le rein. Les résultats sur la glycémie à jeun et la pression artérielle n'ont montré aucune différence significative entre les groupes avant et après le traitement. Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous avons choisi la dose de 500 ng/kg.24h<sup>-1</sup> pour l'ensemble de nos expériences chroniques futures.





Groupes	Contrôle (n=4)	AVP 250 ng.24h <sup>-1</sup> (n=5)	AVP 500 ng.24h <sup>-1</sup> (n=5)	AVP 1000 ng.24h <sup>-1</sup> (n=4)
PAS (mmHg)	130 ± 5	137 ± 5	135 ± 5	137 ± 5
PAD (mmHg)	98 ± 8	103 ± 7	100 ± 8	105 ± 10
PP (mmHg)	35 ± 5	34 ± 4	36 ± 6	37 ± 6
PAM (mmHg)	109 ± 6	113 ± 5	112 ± 8	117 ± 6
Fc (bats.min <sup>-1</sup> )	361 ± 6	349 ± 4	370 ± 6	356 ± 7

PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique ; PP : pression pulsée ;  
PAM : pression artérielle moyenne ; Fc : fréquence cardiaque

### Annexe 3: Paramètres physiologiques des rats Sprague-Dawley traités pendant 4 semaines avec un régime hydraté ou une perfusion de vasopressine (protocole 1).

		Régime hydraté (n = 7)			AVP (500 ng/kg.24h -1) (n = 7)		
		Basal	2 sem.	4 sem.	Basal	2 sem.	4 sem.
Poids corporel		231 ± 2	276 ± 3 *	295 ± 3 \$ <sup>#</sup>	235 ± 3	282 ± 3 *	320 ± 5 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Prise alimentaire		26 ± 1	19 ± 0 *	20 ± 0 \$ <sup>#</sup>	26 ± 1	20 ± 0 <sup>a</sup> *	20 ± 0 \$ <sup>#</sup>
Prise hydrique		26 ± 1	52 ± 0 *	53 ± 1 \$ <sup>#</sup>	24 ± 1	20 ± 1 <sup>a</sup> *	20 ± 1 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Urine							
Débit urinaire		11 ± 1	37 ± 1 *	40 ± 2	9 ± 1	9 ± 1 <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Osmolalité urinaire		1624 ± 166	416 ± 4 *	505 ± 15 \$ <sup>#</sup>	1779 ± 110	1749 ± 91 <sup>a</sup>	1769 ± 93 <sup>a</sup>
Excrétion osmolaire		15 ± 1	15 ± 1	20 ± 1 \$ <sup>#</sup>	15 ± 1	15 ± 1	21 ± 1 \$ <sup>#</sup>
T <sup>c</sup> H <sub>2</sub> O		46 ± 4	14 ± 1 *	27 ± 2 \$ <sup>#</sup>	42 ± 3	42 ± 1 <sup>a</sup>	59 ± 1 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Excrétion de créatinine		45 ± 1	78 ± 3 *	87 ± 3 \$ <sup>#</sup>	42 ± 1	56 ± 3 <sup>a</sup> *	72 ± 2 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Excrétion d'urée		6,64 ± 0,30	6,67 ± 0,44	9,53 ± 0,29 \$ <sup>#</sup>	6,95 ± 0,33	7,09 ± 0,35	9,80 ± 0,33 \$ <sup>#</sup>
Excrétion de sodium		1,97 ± 0,08	1,84 ± 0,04	2,22 ± 0,11 <sup>#</sup>	1,94 ± 0,04	1,94 ± 0,04	2,40 ± 0,07 \$ <sup>#</sup>
Excrétion de potassium		2,76 ± 0,11	2,25 ± 0,06 *	2,40 ± 0,06 \$ <sup>#</sup>	2,71 ± 0,13	2,53 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,05 <sup>a</sup>
Excrétion d'albumine		33 ± 1	28 ± 1 *	49 ± 4 \$ <sup>#</sup>	33 ± 2	41 ± 4 <sup>a</sup> *	71 ± 4 <sup>a</sup> \$ <sup>#</sup>
Plasma							
Hématocrite			47 ± 1	45 ± 2		50 ± 1 <sup>a</sup>	45 ± 1 <sup>#</sup>
Osmola lité plasmatique			317 ± 4	306 ± 1 <sup>#</sup>		304 ± 2 <sup>a</sup>	307 ± 3

• Anova par mesures répétées pour chaque paramètre étudié : effet traitement : p<0,02 ; effet temps : p<0,0001 ; interaction : p<0,02

sauf pour la prise alimentaire, l'excrétion osmolaire, urée, sodium

• Test t de Student non-apparié (comparaison des groupes pour une période donnée) :

a : Régime hydraté vs. AVP, p<0,02

• Test t de Student apparié (comparaison des périodes pour un groupe donné) :

\* : 2 sem. vs. basal, p<0,05

\$ : 4 sem. vs. basal, p<0,01

# : 4 sem. vs. 2 sem., p<0,03

#### Annexe 4 : Paramètres physiologiques des rats Sprague-Dawley traités pendant 4 semaines avec de la vasopressine seule ou co-traités avec l'antagoniste V1a (protocole 2).

	AVP (500 ng/kg.24h -1) (n = 7)			AVP (500 ng/kg.24h -1) + SSR49059 (30 mg/kg.24h -1) (n = 8)		
	Basal	2 sem.	4 sem.	Basal	2 sem.	4 sem.
Poids corporel						
g	224 ± 4	244 ± 3 *	269 ± 3 \$ <sup>#</sup>	224 ± 3	242 ± 3 *	266 ± 2 \$ <sup>#</sup>
Prise alimentaire						
g.24h <sup>-1</sup>	20 ± 2	20 ± 0	18 ± 0 <sup>#</sup>	21 ± 1	20 ± 0	18 ± 0 \$ <sup>#</sup>
Prise hydrique						
ml.24h <sup>-1</sup>	29 ± 2	23 ± 2 *	22 ± 2 \$	27 ± 2	20 ± 1 *	20 ± 1 \$
Urine						
Débit urinaire						
ml.24h <sup>-1</sup>	12 ± 1	13 ± 2	10 ± 2	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 1
Osmolalité urinaire						
mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	1406 ± 155	1575 ± 179	1870 ± 238 \$	1644 ± 144	1827 ± 133 *	1845 ± 150
Excrétion osmolaire						
mosm.24h <sup>-1</sup>	16 ± 1	19 ± 1 *	17 ± 1	16 ± 1	18 ± 1 *	20 ± 1 \$ <sup>#</sup>
T <sup>5</sup> H <sub>2</sub> O						
ml.24h <sup>-1</sup>	41 ± 3	50 ± 2 *	47 ± 2 \$	42 ± 2	51 ± 2 *	56 ± 1 \$ <sup>#</sup>
Excrétion de créatinine						
μmol.24h <sup>-1</sup>	64 ± 4	46 ± 3 *	62 ± 4 <sup>#</sup>	57 ± 2	46 ± 2 *	74 ± 2 \$ <sup>#</sup>
Excrétion d'urée						
mmol.24h <sup>-1</sup>	7,57 ± 0,41	8,15 ± 0,18	8,75 ± 0,48	7,17 ± 0,24	8,12 ± 0,21 *	11,43 ± 0,68 \$ <sup>#</sup>
Excrétion de sodium						
mmol.24h <sup>-1</sup>	1,86 ± 0,11	1,96 ± 0,06	1,52 ± 0,04 <sup>#</sup>	1,79 ± 0,09	2,00 ± 0,04	1,70 ± 0,03 \$ <sup>#</sup>
Excrétion de potassium						
mmol.24h <sup>-1</sup>	3,40 ± 0,10	2,90 ± 0,08 *	2,45 ± 0,09 \$ <sup>#</sup>	3,28 ± 0,16	2,90 ± 0,09 *	2,83 ± 0,05 \$ <sup>b</sup> \$
Excrétion d'albumine						
μg.24h <sup>-1</sup>	nd	nd	37 ± 3	nd	nd	47 ± 2 <sup>b</sup>
Plasma						
Hématocrite						
%	45 ± 2	52 ± 1 *	49 ± 1	44 ± 1	51 ± 1 *	49 ± 1
Osmolalité plasmatique						
mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	295 ± 2	293 ± 3	293 ± 2	293 ± 2	290 ± 2	290 ± 1

• Anova par mesures répétées pour chaque paramètre étudié : p = ns

• Test t de Student non-apparié (comparaison des groupes pour une période donnée) :

b : AVP + antagoniste V1a vs. AVP, p<0,03

• Test t de Student apparié (comparaison des périodes pour un groupe donné) :

\* : 2 sem. vs. basal, p<0,04

§ : 4 sem. vs. basal, p<0,05

# : 4 sem. vs. 2 sem., p<0,03

nd : non déterminé



## Annexe 5 : Paramètres physiologiques des rats Zucker Lean soumis aux différents traitements pendant 4 semaines

	Régime hydraté (n = 8)				Contrôle (n = 7)				AVP (500 ng/kg.24h <sup>-1</sup> )(n = 7)				AVP (500 ng/kg.24h <sup>-1</sup> ) + SSR49059 (30 mg/kg.24h <sup>-1</sup> ) (n = 7)			
	Basal		2 sem.		Basal		2 sem.		Basal		2 sem.		Basal		2 sem.	
	Basal	2 sem.	4 sem.		Basal	2 sem.	4 sem.		Basal	2 sem.	4 sem.		Basal	2 sem.	4 sem.	
Poids corporel	g	241 ± 12	280 ± 9	299 ± 8	241 ± 12	284 ± 10	302 ± 9		238 ± 9	270 ± 6	295 ± 8		234 ± 12	277 ± 9 a	301 ± 9	
Prise alimentaire	g.24h <sup>-1</sup>	21 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 1	20 ± 0	20 ± 0		21 ± 1	20 ± 0	20 ± 0		21 ± 1	20 ± 0	30 ± 0	
Prise hydrique	ml.24h <sup>-1</sup>	16 ± 0	62 ± 1	64 ± 1	16 ± 1	18 ± 1 ***	17 ± 1 ***		16 ± 1	18 ± 1 ***	19 ± 1 ***		16 ± 1	19 ± 0 ***	19 ± 0 ***	
<b>Urine</b>																
Débit urinaire	ml.24h <sup>-1</sup>	5,9 ± 0,5	29,5 ± 0,7	33,8 ± 1	6,3 ± 0,6	6,3 ± 0,5 ***	7,4 ± 0,6 ***		6,4 ± 0,4	6,5 ± 0,2 ***	7,6 ± 0,9 ***		6,1 ± 0,4	6,9 ± 0,7 ***	7,9 ± 1,1 ***	
Osmolalité urinaire	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	2367 ± 114	473 ± 15	489 ± 19	2375 ± 152	2320 ± 78 ***	2520 ± 134 ***		2432 ± 138	2296 ± 78 ***	2413 ± 174 ***		2354 ± 105	2244 ± 105 ***	2257 ± 187 ***	
Excrétion osmolaire	mosm.24h <sup>-1</sup>	13,7 ± 0,8	13,9 ± 0,4	16,5 ± 0,7	14,5 ± 0,8	14,6 ± 1,2	18,3 ± 1		15,2 ± 0,4	14,9 ± 0,3	17,7 ± 1,1		14,3 ± 0,8	15,1 ± 0,9	16,7 ± 1,2	
T <sub>H2O</sub>	ml.24h <sup>-1</sup>	40 ± 2	17 ± 1	21 ± 2	42 ± 2	42 ± 4 ***	54 ± 3 ***		44 ± 1	43 ± 1 ***	52 ± 3 ***		41 ± 2	44 ± 3 ***	48 ± 3 ***	
Excrétion de créatinine	μmol.24h <sup>-1</sup>	78 ± 5	77 ± 4	95 ± 5	79 ± 4	90 ± 1	101 ± 5		78 ± 2	81 ± 3	106 ± 5		76 ± 3	86 ± 3	96 ± 4	
Excrétion d'urée	mmol.24h <sup>-1</sup>	7,43 ± 0,32	7,72 ± 0,15	9,50 ± 0,25	7,56 ± 0,37	9,00 ± 0,23 **	10,60 ± 0,46 **		7,98 ± 0,22	8,00 ± 0,20	10,36 ± 0,52		7,68 ± 0,42	8,57 ± 0,42 *	10,83 ± 0,54	
Excrétion de sodium	mmol.24h <sup>-1</sup>	1,96 ± 0,10	1,25 ± 0,06	1,60 ± 0,10	2,01 ± 0,11	2,20 ± 0,08 ***	1,90 ± 0,14		2,03 ± 0,07	2,12 ± 0,08 ***	2,01 ± 0,15		1,95 ± 0,11	2,14 ± 0,05 ***	1,79 ± 0,12	
Excrétion de potassium	mmol.24h <sup>-1</sup>	22,40 ± 0,13	1,98 ± 0,02	2,18 ± 0,13	2,47 ± 0,11	2,53 ± 0,08	2,41 ± 0,27		2,54 ± 0,07	2,32 ± 0,05	2,31 ± 0,21		2,34 ± 0,11	2,43 ± 0,10	2,33 ± 0,25	
<b>Plasma</b>																
Hématocrite	%	48 ± 1	50 ± 1	47 ± 2	46 ± 1	48 ± 1	45 ± 2		46 ± 1	49 ± 1	48 ± 3		46 ± 2	50 ± 1 a	48 ± 2	
Osmolalité plasmatique	mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	296 ± 2	297 ± 1	307 ± 2	297 ± 1	297 ± 1	306 ± 2		298 ± 3	296 ± 1	304 ± 3		306 ± 4 #**	299 ± 2 ##	308 ± 3	
Créatinine	μmol.l <sup>-1</sup>	27 ± 3	21 ± 1	15 ± 3	27 ± 3	23 ± 1	19 ± 3		24 ± 1	22 ± 1	20 ± 4		22 ± 3	22 ± 2	14 ± 4	
Urée	mmol.l <sup>-1</sup>	4,7 ± 0,4	3,8 ± 0,3	5,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,8 ± 0,3		6 ± 1,3	4,3 ± 0,3	5 ± 0,3		5,2 ± 1,2	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,4	
Sodium	mmol.l <sup>-1</sup>	152 ± 1	147 ± 1	144 ± 1	152 ± 1	146 ± 1	140 ± 3		150 ± 1	147 ± 1	144 ± 1		151 ± 0	147 ± 1	146 ± 3	
Potassium	mmol.l <sup>-1</sup>	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,3	5,5 ± 0,5	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,3		5,5 ± 0,6	5 ± 0,3	6 ± 0,4		5,3 ± 0,8	5 ± 0,3	5,4 ± 0,4	

Anova à deux facteurs suivi par un test de Fisher *post hoc* : Régime hydraté vs. autres groupes, \*, p<0,01 ; \*\*, p<0,001 ; \*\*\*, p<0,0001; Antagoniste V1a vs. autres groupes : #, p<0,05 ; ##, p<0,001

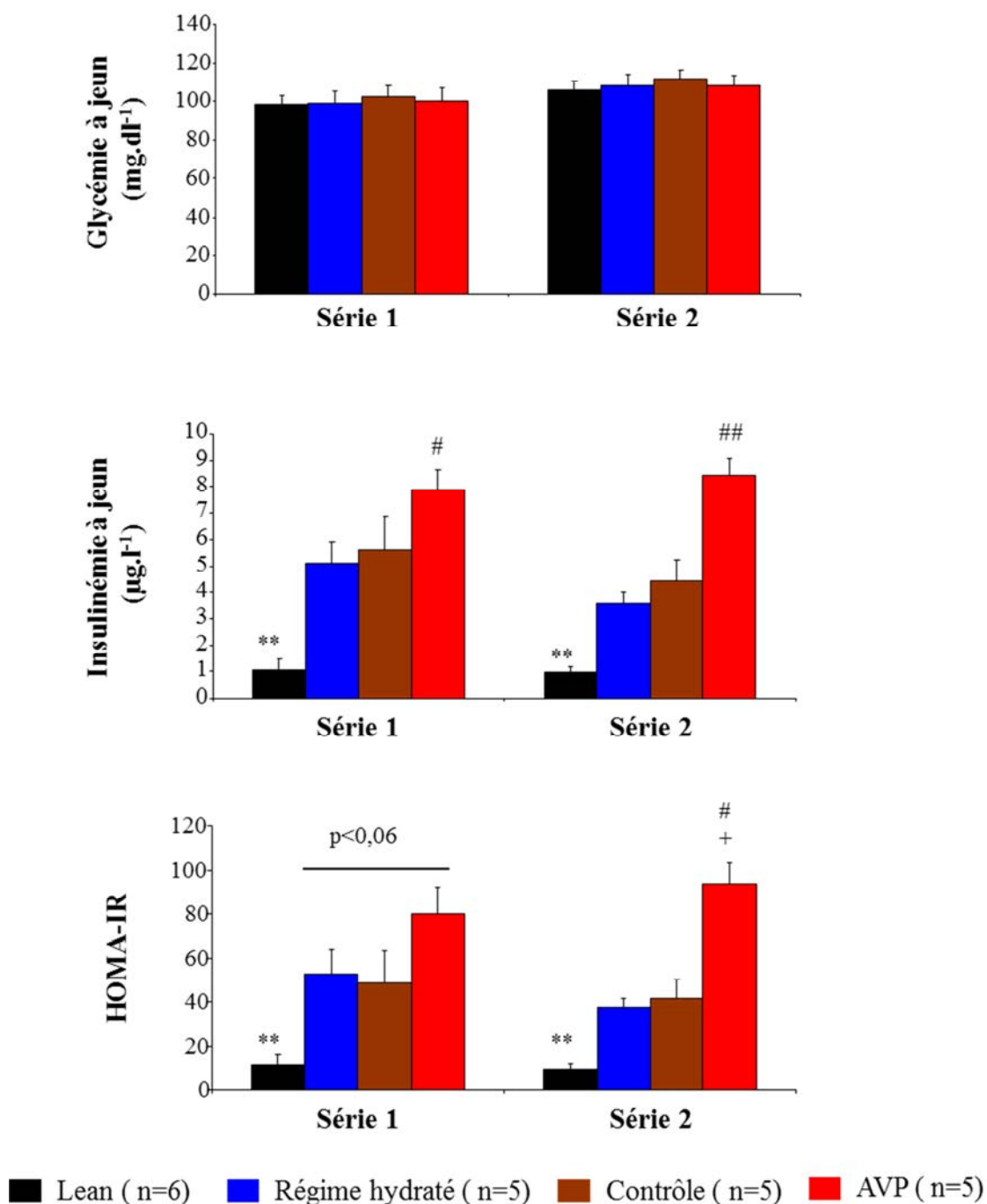
## Annexe 6 : Paramètres physiologiques des rats Zucker Obèses soumis aux différents traitements pendant 4 semaines

	Lean (n = 6)				Obèse Régime hydraté (n = 6)				Obèse Contrôle (n = 5)				Obèse AYP (n = 6)			
	Basal	2 sem.	4 sem.	Basal	2 sem.	4 sem.	Basal	2 sem.	4 sem.	2 sem.	4 sem.	Basal	2 sem.	4 sem.	2 sem.	4 sem.
<b>Poids</b>																
g	202 ± 12	247 ± 8	291 ± 11	255 ± 12	332 ± 8 ***	402 ± 7 ***	263 ± 16	329 ± 10 ***	388 ± 11 ***			254 ± 11	316 ± 10 ***	363 ± 9 *** #		
Prise alimentaire g.24h <sup>-1</sup>	18 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	27 ± 1	31 ± 1 ***	32 ± 1	28 ± 1 ***	28 ± 1 ***	38 ± 1			28 ± 1 ***	27 ± 1 ***	27 ± 1		
Prise hydrique ml.24h <sup>-1</sup>	16 ± 1	18 ± 1 ###	21 ± 2 ###	20 ± 1	100 ± 4	97 ± 3	18 ± 3	21 ± 1 ###	22 ± 2 ###			22 ± 3	21 ± 1 ###	22 ± 2 ###		
<b>Urine</b>																
Débit urinaire ml.24h <sup>-1</sup>	6,3 ± 0,5	6,6 ± 1,0	7,0 ± 1,0	11,3 ± 1,1	59,5 ± 6,3 ***	52,5 ± 4,3 ***	12,3 ± 1,3 *	11,1 ± 1,4 * ###	9,5 ± 0,4 ###			12,4 ± 1,2 *	10,8 ± 0,9 * ###	9,1 ± 0,3 ###		
Osmolalité urinaire mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	2313 ± 67	2447 ± 78	2360 ± 142	2563 ± 63	559 ± 60 ***	619 ± 27 ***	2538 ± 104	2438 ± 95 ###	2687 ± 82 ###			2322 ± 96	2499 ± 87 ###	2711 ± 95 * ###		
Excrétion osmolaire mosm.24h <sup>-1</sup>	14,5 ± 1,0	15,9 ± 2,0	16,2 ± 0,7	26,7 ± 2,4 ***	31,4 ± 0,3 ***	32,3 ± 2,4 ***	28,5 ± 2,8 ***	26,7 ± 2,4 *** #	25,5 ± 1,1 *** #			28,4 ± 2,2 ***	26,8 ± 2,0 *** #	24,7 ± 1,1 *** #		
T <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	42 ± 3	47 ± 6	47 ± 2	78 ± 7 **	45 ± 6	55 ± 5	83 ± 8 ***	78 ± 6 ***	76 ± 3 ***			82 ± 6 ***	78 ± 6 ***	73 ± 4 ***		
Excrétion de créatinine mmol.24h <sup>-1</sup>	64 ± 4	75 ± 2	96 ± 5	64 ± 5	79 ± 8	83 ± 2	69 ± 3	80 ± 4	91 ± 3			64 ± 2	81 ± 3	86 ± 4		
Excrétion d'urée mmol.24h <sup>-1</sup>	7,38 ± 0,08	9,84 ± 0,10	8,25 ± 0,49	15,80 ± 1,78 *	20,33 ± 1,12 *	16,68 ± 1,16 *	16,27 ± 0,18 *	17,27 ± 2,06 *	14,04 ± 0,69 *			17,0 ± 0,18 *	18,78 ± 0,13 *	13,34 ± 0,50 *		
Excrétion de sodium mmol.24h <sup>-1</sup>	1,75 ± 0,06	2,30 ± 0,38	2,02 ± 0,11	2,70 ± 0,17 *	2,78 ± 0,22	2,45 ± 0,08	2,82 ± 0,18 *	2,96 ± 0,21	2,96 ± 0,18			2,72 ± 0,08 *	2,88 ± 0,11	2,93 ± 0,13		
Excrétion de potassium mmol.24h <sup>-1</sup>	2,55 ± 0,13	3,00 ± 0,50	2,45 ± 0,17	4,08 ± 0,30 *	4,37 ± 0,18	3,77 ± 0,16	4,21 ± 0,32 ***	4,20 ± 0,35	3,36 ± 0,16			4,27 ± 0,27 *	4,13 ± 0,32	3,21 ± 0,10		
<b>Plasma</b>																
Hématocrite %	45 ± 1	47 ± 1	46 ± 1	47 ± 1	49 ± 1	43 ± 1	47 ± 1	48 ± 1	43 ± 1			48 ± 1	46 ± 1	44 ± 3		
Osmolalité plasmatique mosm.kg <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O	293 ± 2	290 ± 1	287 ± 2	299 ± 2	295 ± 2	291 ± 1	295 ± 2	292 ± 1	292 ± 2			298 ± 1	291 ± 2	291 ± 2		
Créatinine μmol.l <sup>-1</sup>	13 ± 1	16 ± 1	18 ± 2	13 ± 1	13 ± 1 *	14 ± 1 *	13 ± 1	15 ± 2	15 ± 1			13 ± 0	13 ± 1 *	14 ± 1 *		
Urée mmol.l <sup>-1</sup>	3,9 ± 0,4	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	6,8 ± 0,4 ***	6,6 ± 0,5	6,2 ± 0,3	6,9 ± 0,5 ***	6,5 ± 0,4	5,8 ± 0,2			7,1 ± 0,4 ***	6,7 ± 0,3	6,7 ± 0,4		
Sodium mmol.l <sup>-1</sup>	142 ± 1	143 ± 2	137 ± 2	141 ± 1	143 ± 2	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1			142 ± 1	141 ± 1	139 ± 2		
Potassium mmol.l <sup>-1</sup>	5,0 ± 0,3	4,4 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,4 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2	4,9 ± 0,4	5,5 ± 0,2			5,4 ± 0,2	4,9 ± 0,4	5,7 ± 0,3		

Anova à deux facteurs suivi par un test de Fisher *post hoc* : Lean vs. autres groupes, \*, p<0,01; \*\*, p<0,001; \*\*\*, p<0,0001  
Régime hydraté vs. autres groupes : #, p<0,01; ##, p<0,001; ###, p<0,0001



## Annexe 7 : Etude comparative des effets chroniques de la vasopressine sur le métabolisme glucidique, après 2 semaines de traitement sur 2 séries de rats Zucker Obèses différentes.



Anova à un facteur suivie par un test de Fisher *post Hoc* :

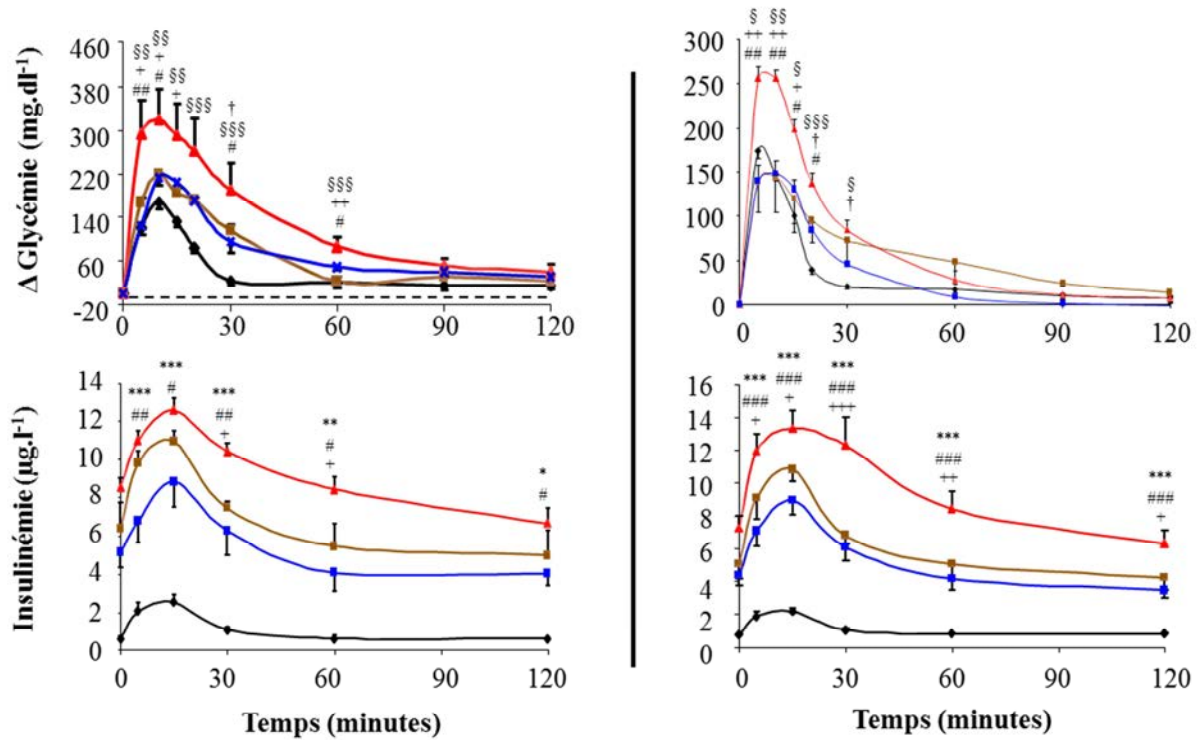
AVP vs. Contrôle : +,  $p < 0,05$  ; AVP vs. Régime hydraté : #,  $p < 0,05$  ; ##,  $p < 0,001$  ;

Lean vs. autres groupes, \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,001$  ; \*\*\*,  $p < 0,0001$

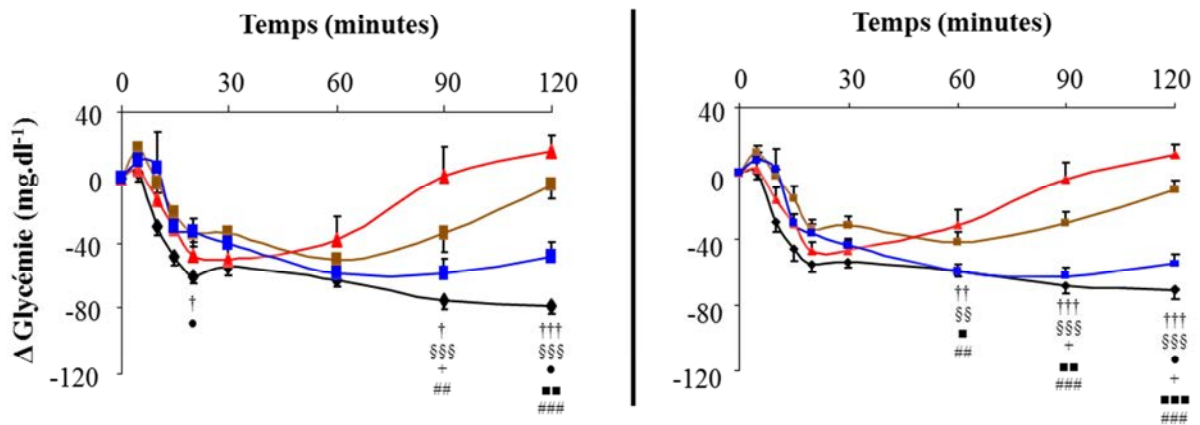
## Série 1

## Série 2

### Test de Tolérance au glucose (1,5 g/ kg poids corporel)



### Test de Tolérance à l'insuline (1 U/ kg poids corporel)



■ Lean (n=6) ■ Régime hydraté (n=5) ■ Contrôle (n=5) ■ AVP (n=5)

Anova à un facteur suivie par un test de Fisher *post Hoc* :

AVP vs. Contrôle : +, p<0,05 ; ++, p<0,001 ; +++, p<0,0001 ; AVP vs. Régime hydraté : #, p<0,05 ; ##, p<0,001 ;

###, p<0,0001 ; AVP vs. Lean : §, p<0,05 ; §§, p<0,001 ; §§§, p<0,0001 ; Lean vs HWI : ●, p<0,05 ;

CT vs. HWI : ■, p<0,05 ; ■■, p<0,001 ; ■■■, p<0,0001 ; Lean vs CT : †, p<0,05 ; ††, p<0,001 ; †††, p<0,0001 ;

Lean vs. autres groupes, \*, p<0,05 ; \*\*, p<0,001 ; \*\*\*, p<0,0001

Article : Vasopressin and hydration play a major role in the developpement of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats

**VASOPRESSIN AND HYDRATION PLAY A MAJOR ROLE IN  
THE DEVELOPMENT OF GLUCOSE INTOLERANCE AND  
HEPATIC STEATOSIS IN OBESE RATS**

Journal:	<i>Diabetologia</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Keywords:	1.01 Basic science, 2.02 Animal - rat, 3.04 Pathophysiology / Metabolism (all), 3.04.08 Other hormones / action, 3.04.14 Metabolic syndrome

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Review

# CHRONIC HIGH VASOPRESSIN LEVEL INCREASES BASAL GLYCEMIA IN LEAN ZUCKER RATS AND EXACERBATES GLUCOSE INTOLERANCE IN OBESE ZUCKER RATS

Short title: chronic vasopressin and glucose metabolism

Christopher TAVEAU<sup>1, 2, 3</sup>, Catherine CHOLLET<sup>1, 2, 3</sup>, Ludovic WAECKEL<sup>1, 2, 3</sup>, Dorinne DESPOSITO<sup>1,2,3</sup>, Daniel BICHET<sup>10</sup>, Marie-Françoise ARTHUS<sup>10</sup>, Christophe MAGNAN<sup>4, 5</sup>, Erwann PHILIPPE<sup>4, 5</sup>, Valerie PARADIS<sup>5, 6</sup>, Fabienne FOUFELLE<sup>1, 2, 3</sup>, Isabelle HAINAULT<sup>1, 2, 3</sup>, Sofia ENHORNING<sup>8, 9</sup>, Gilberto VELHO<sup>1, 2, 3</sup>, Ronan ROUSSEL<sup>1, 5, 7</sup>, Lise BANKIR<sup>1, 2, 3</sup>, Olle MELANDER<sup>8, 9</sup>, Nadine BOUBY<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> INSERM 1138, Cordeliers Research Center, Paris, France

<sup>2</sup> Pierre & Marie Curie University, Paris, France

<sup>3</sup> Paris Descartes University, Paris, France

<sup>4</sup> CNRS UMR 8251, Paris, France

<sup>5</sup> Paris Diderot University, Paris, France

<sup>6</sup> Anatomy and Pathology department, Beaujon Hospital, Paris

<sup>7</sup> Diabetology-Endocrinology-Nutrition, DHU FIRE, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

<sup>8</sup> Department of Clinical Sciences, Malmö, Lund University, Malmö, Sweden

<sup>9</sup> Department of Internal Medicine, Malmö, Skåne University Hospital, Malmö, Sweden

<sup>10</sup> Sacré-Coeur Hospital, Montreal, Canada

Corresponding author

Nadine BOUBY

INSERM U1138

Centre de Recherches des Cordeliers

15 rue de l'Ecole de Medecine 75006 Paris, France

tel 00 33 1 44 27 81 14

email: nadine.bouby@crc.jussieu.fr

word count: 3841

number of tables and figures: 8

## ABSTRACT

**Aims/hypothesis** High plasma copeptin, a marker of vasopressin (VP) secretion, has been shown to be associated with the metabolic syndrome and development of type 2 diabetes in humans. The present study was designed to determine the long-term influence of plasma VP concentration in a rodent model prone to metabolic dysfunction.

**Methods** Obese Zucker rats and their lean counterparts were chronically submitted to one of three protocols inducing different levels of VP. Circulating VP was either reduced by increasing the daily water intake (low-VP), or increased by a chronic intraperitoneal infusion of VP (high-VP). The control rats had normal VP level depending on their own regulation of water intake and vasopressin secretion.

**Results** Compared to controls with normal VP, lean rats with high-VP had a higher fasting glycaemia after 4 weeks. In obese rats, high-VP promoted hyperinsulinaemia, glucose intolerance, assessed by glucose and insulin tolerance tests, and impaired response to a pyruvate challenge. Low-VP obese rats had unchanged glucose tolerance but exhibited a drastic decrease in liver steatosis compared to control obese rats, associated with low hepatic content in triglycerides and cholesterol, and reduced expression of hepatic lipogenic genes. These effects were independent of changes in body adiposity, and plasma sodium and osmolality did not differ among groups.

**Conclusions/interpretation** These findings show a causal relationship between the VP-hydration axis and the metabolic risk. Therapeutic perspectives include diet recommendations regarding hydration, but also potential pharmacological interventions targeting vasopressin V1 receptors.

## INTRODUCTION

Although it has been known for several decades that plasma vasopressin (VP) is increased in patients with type 1 or with type 2 diabetes mellitus (1) and in animal models of diabetes (2, 3), only recently has the vasopressin-hydration axis emerged as a risk factor for impaired glucose homeostasis and diabetes. An increasing body of data suggests that VP may play a part in glucose homeostasis, besides its well defined role in urine concentration and body water homeostasis. Acute VP infusion in the rat and in healthy subjects was shown to induce a transient rise in blood glucose concentration (4, 5). Ex vivo studies showed that VP stimulates gluconeogenesis and glycogenolysis through the activation of hepatic V1a receptors (V1aR), and the release either of glucagon or insulin, depending on concomitant extracellular glucose levels, through the activation of V1b receptors (V1bR) in pancreatic islets (6-8). Furthermore, VP stimulates adrenocorticotropin hormone release through activation of pituitary V1bR (9, 10). The finding that mice with deletion of V1a and/or V1b receptors exhibit metabolic disorders (11-14) prompted several epidemiological investigations in humans.

Plasma copeptin, a stable surrogate marker for vasopressin derived from the same prohormone (15), was shown to be associated with insulin resistance, metabolic syndrome and obesity (16). High plasma copeptin predicted future diabetes mellitus independently of known risk factors (17). Vasopressin and copeptin secretion are strongly dependent on the level of hydration. We reported that water intake was inversely and independently associated with the risk of developing hyperglycemia in a cohort of the French general population (18). Additionally, VP was shown to contribute to albuminuria and to diabetes-induced nephropathy in animal models (19, 20). Epidemiological studies in humans are consistent with these findings (20-22).

These observations suggest that a high level of circulating vasopressin has adverse consequences on glucose metabolism, although a causal link between a sustained high level of vasopressin and disorders of glucose homeostasis has not been established. The present investigation was designed to evaluate the long-term impact on glucose homeostasis of various levels of circulating vasopressin. The experiments were performed in obese Zucker rats, a genetic model of insulin resistance, and in their lean controls. VP level was altered chronically in both directions, by either VP infusion or an increase in water intake. We showed that VP impaired tolerance to a glucose load, but also induced a marked rise of plasma glucose after pyruvate administration. Unexpectedly, a reduction in plasma VP lead to improvement of hepatic lipid metabolism and liver steatosis.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Animals and Treatments**

All animal procedures were conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals (L 358-86/609/EEC). Male 6 week-old lean (*Fa/fa*) and genetically obese (*fa/fa*) Zucker rats harboring a missense mutation in the leptin receptor gene were used (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). After adaptation to individual metabolic cages (Techniplast, Limonest, France) for 1 week, rats of each strain were divided into three groups of equivalent body weight, urine volume and osmolality, and fasting glycaemia and submitted for the next four weeks to one of three protocols inducing different levels of VP. In the Low-VP group, endogenous VP was lowered by increasing the daily water intake. This was achieved by incorporating the daily food ration in a water-rich agar gel bringing 3ml water and 40mg agar per g food [23]. In the high-VP group, circulating VP was



enhanced by a chronic i.p. infusion of VP (500 ng.kg<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, St Quentin, France) via osmotic Alzet minipumps. The Norm-VP rats had normal VP level depending on their own regulation of water intake and vasopressin secretion. All rats had free access to demineralized water. They were fed a standard diet (A04, Safe, Augy, France). To ensure the same food intake in all groups, all rats were offered each day an amount of food slightly lower than their spontaneous intake (20 or 25g/day to lean or obese rats, respectively).

### **Plasma and urinary parameters**

Blood samples were taken and body weight, water and food intake, and urine volume were measured every second week. Data from two 24h urine collections were averaged for each rat. The following parameters were measured: urine and plasma osmolality (freezing point osmometer, Roebling, Germany), urinary vasopressin concentration (RIA as described previously [24]), plasma concentration of sodium and potassium (flame photometer, Instrumentation Laboratory, France), triglyceride and total cholesterol (automatic analyser Konelab201, Thermo Electron, Ilkirch, France) and apelin (Elisa kit, Phoenix Pharmaceutical, Strasbourg, France).

### **Glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests and pyruvate challenge**

At the end of the 2nd and 4th week of treatments, GTT (1.5 g/kg) and ITT (1 U/kg) were performed after a 6-h fasting period by i.p. injection. Each test was separated by two resting days. Insulin resistance (IR) was estimated according to the following equation  $IR = FPI \times FBG / 22.5$ , where FPI is the fasting plasma insulin concentration (mU/L) and FBG the fasting blood glucose concentration (mmol.L<sup>-1</sup>). Blood samples were collected from the tail tip at 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 and 120 min after the injection. Glucose concentrations were measured using diagnostic glucometer (Lifescan Laboratories, Issy-les-Moulineaux,

France). Plasma insulin and glucagon concentrations were determined using ELISA kits (Mercodia, Uppsala, Sweden). Pyruvate test was performed by i.p. injection of sodium pyruvate (1g/kg) in other series of three groups of obese rats treated for 2 weeks as described above. Areas under the curves (AUC) were calculated as the net area contained between the experimental curve and the individual baseline (set by the value at time 0), using the trapezoidal rule.

### **Fat /Lean body mass measurements**

Body composition was measured in live animals by nuclear magnetic resonance imaging (EchoMRI 900, Houston, TX)

### **Analysis of gene expression**

Total RNA was extracted from a piece of liver with Trizol according to manufacturer's instructions (Life Technologies, St Aubin, France). Reverse transcription and real time PCR were carried out to assess the gene expression of V1aR (*Avpr1a*), G6P (*G6pc*), GPI (*Pygl*), PEPCK (*Pck1*), glucose transporter-1 and -2 (*Slc2a1*, *Slc2a2*), AQP-9 (*Aqp9*), FAS (*Fasn*), SREBP-1c (*Srebf1*), SREBP-2 (*Srebf2*) (see ESM Methods). Data were normalized to 18S rRNA. Changes in the target genes relative to their mean expression in the Norm-VP group were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  comparative method [25].

### **Histological analysis**

Small pieces of liver tissue were frozen at -80°C and routinely processed for histopathological analysis. Five  $\mu$ m-thick sections of tissue were stained with haematoxylin-eosin (H&E) and Sirius red. Steatosis, necroinflammation as well as portal and perisinusoidal fibrosis were then assessed by light microscopy.

### **Hepatic triglyceride, cholesterol and glycogen content**

Triglycerides and cholesterol liver content was determined using commercial kits (Randox laboratories, Crumlin, UK). Liver glycogen content was determined according to Bergmeyer (26). Briefly, 100 mg liver was homogenized in 0.2 mol/l acetate buffer and incubated in the presence of  $\alpha$ -(1–4),(1–6)-amylglucosidase (Roche Diagnostics, Meylan, France) for 1 h at 55°C. Glucose released was then measured by enzymatic spectrophotometric assays.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA test followed, when appropriate, by the Fisher protected least significant difference (LSD) *post hoc* test. Student's paired t test was used to compare results obtained in the same rats at different time after treatment onset. Significance was set at  $P < 0.05$ . Results obtained in obese and lean strains were analyzed independently.

## **RESULTS**

### **Effect of chronic VP modulation on body growth and water homeostasis in lean and obese Zucker rats**

To determine if VP is involved in the regulation of glucose homeostasis under insulin-sensitive and insulin-resistant conditions, we examined the effect of three different levels of circulating VP in Zucker lean and obese rats. Experiments were performed separately in the rats of the two genotypes. Physiological characteristics of lean and obese rats after two weeks of treatment are presented in Tables 1 and 2, respectively. Plasma and urine data after four weeks of treatment were not different from those measured on the second week (not shown).

Rats of the three groups of each genotype grew regularly during the whole experiment. There was no difference in body weight among the groups. Treatments did not change the body composition measured by MRI in obese rats after 4 weeks of treatment (fat proportion:  $48\pm1$ ,  $46\pm1$ ,  $41\pm1\%$  relative to body weight in Low-VP, Norm-VP and High-VP groups respectively).

The chronic increase in water intake lowered urinary VP excretion in Low-VP rats to about 1/10th of that in control Norm-VP rats, in both obese and lean rats. The infusion of VP resulted in a 10 to 25-fold increase in daily urinary VP excretion in High-VP rats of both genotypes compared to Norm-VP rats. These values are comparable than those observed after 24h dehydration in normal rats (27).

As expected, 24h water intake and urine volume were markedly higher in Low-VP than in Norm-VP group. In contrast, VP infusion did not reduce 24h fluid intake or urine volume and did not increase urine osmolality in the High-VP group compared to the Norm-VP group. This is probably due to the influence of VP on renal V1aR that has been shown to attenuate the antidiuretic/antinatriuretic V2R-mediated effects, as described previously (27). Note that, in spite of differences in urine osmolality, daily osmolar excretion was comparable in all three groups, as expected from the equivalent food intake imposed to all rats. There was no significant difference in plasma osmolality, natremia, kaliemia or hematocrit among the different groups.

### **High VP level increases fasting glycemia and impairs glucose tolerance in lean rats**

To determine the metabolic consequences of different levels of circulating VP concentration in lean rats, fasting blood glucose and plasma insulin were measured and i.p. GTT was performed. Chronic high VP level during four weeks resulted in a progressive rise in fasting glycemia (Fig 1A). On week 4, glycemia difference between High- and Norm-VP

groups amounted to 1.5 mmol/L paralleled by 4-fold higher values of insulinemia in the High-VP group ( $146 \pm 26$  vs  $34 \pm 9$  nmol/L,  $p < 0.05$ ). Consequently, HOMA-IR was 4-fold higher in the High-VP than in the Norm-VP groups of rats. Glucose tolerance was significantly impaired in High-VP group as demonstrated by GTT (Fig 1B). Low-VP level slightly decreased fasting glycemia but did not change glucose response during GTT compared to the Norm-VP group (Fig 1A, 1B).

### **High VP level aggravates disorders of glucose metabolism in obese, insulin-resistant rats**

Based on the above results, we speculated that VP might be also involved in the regulation of glucose metabolism under insulin-resistant conditions. To test this possibility we examined the effect of VP on Zucker obese rats.

No difference was observed in plasma concentration of triglycerides or total cholesterol or in fasting blood glycemia among the differently treated groups of obese rats. However, chronic VP infusion induced a significant increase in fasting insulinaemia ( $674 \pm 107$ ;  $1449 \pm 112$ ;  $1217 \pm 65$  nmol/l before, after 2 and 4 weeks of treatment, respectively,  $p < 0.001$ ). Thus HOMA-IR was 50% higher in High-VP than in the two other groups, already after two weeks of treatment (Fig 2A). At this time point, an *i.p.* glucose load induced 2-fold higher level of glycemia and insulinaemia responses in the High-VP group than in the other groups (Fig 2B, Table 3). Similar results were obtained after 4 weeks of treatment (Table 3).

To understand the effect of VP on glucose tolerance, we assessed the effect of VP on hepatic gluconeogenic capacity with a pyruvate test. Glucose excursion in the next two hours was markedly increased by high-VP treatment, peaking with a 2-fold greater glycemia than in the other groups (Fig 2C). Treatments did not change mRNA abundance of genes coding for

enzymes involved in gluconeogenesis and glycogenolysis or expression of hepatic glucose transporters (Table 4). Obese High-VP rats exhibited a 50% higher V1aR mRNA abundance than Norm-VP rats ( $1.52 \pm 0.15$  vs  $1.00 \pm 0.15$ ,  $p < 0.01$ ) while Low-VP rats tended to show a 25% decline ( $0.73 \pm 0.13$ , non significant).

During ITT, plasma insulin levels reached significantly higher values in High-VP rats than in other rats 15 min after insulin injection ( $4138 \pm 130$ ,  $3194 \pm 4047$  and  $2419 \pm 426$  pmol/l, in High-VP, Norm-VP, and Low-VP groups, respectively,  $p < 0.03$ ) due to differences in basal values. Despite these differences in insulinaemia, the initial fall in glycemia was similar between groups (Fig 3) and plasma glycemia returned faster to baseline level in High-VP rats than in Norm-VP rats resulting in smaller values for area under curve (Table 3), arguing for a lower sensitivity to insulin in high VP animals. Sustained hypoglycaemia persisted in Low-VP rats all along the test, with significantly lower values of glycemia at time points 90 and 120 min ( $p < 0.01$ ) (Fig 3). Changes in plasma glucagon concentration following insulin-induced hypoglycaemia were similar in all groups.

#### **Low-VP protects liver tissue from steatosis in obese rats by preventing upregulation of lipogenesis**

To determine whether VP-induced alterations in hepatic glucose metabolism were accompanied by changes in lipid metabolism we performed histological analyses of liver sections and quantified lipid content and expression levels of enzymes involved in lipogenesis (Fig 4). Zucker obese rats showed marked steatosis compared to lean rats. High-VP and Norm-VP obese rats showed similar degree and type of steatosis, characterized by mediovesicles and macrovacuoles mainly localized in the centro- and medio-lobular areas. Mild (*moderate*) necroinflammation was observed. Neither portal nor perisinusoidal fibrosis

was detected in the different groups. Interestingly, Low-VP rats with high hydration had almost no steatosis after 2 weeks of treatment (Fig 4A).

Hepatic lipid content paralleled the histological changes. Low-VP/high hydration markedly decreased cholesterol and triglyceride content compared to Norm-VP (Fig 4B) as well as gene expression of proteins involved in lipogenesis FAS, SREBP-1c and AQP-9 (Fig 4C). Low-VP was also associated with an increase in hepatic glycogen content (Fig 4B).

## **DISCUSSION**

This work was designed to investigate the chronic effect of vasopressin on glucose homeostasis in rats. We demonstrated that sustained high vasopressin level alters glucose metabolism, increasing glycaemia in lean healthy rats and impairing glucose tolerance in obese rats. The results of this study point also to a beneficial effect of low VP level and high hydration to alleviate the hepatic steatosis associated with obesity in this model.

Previous studies evaluated the role of VP and VP receptors on glucose tolerance using VP-deficient rat or mice with inactivation of the V1aR and/or V1bR. Conflicting results with AVP-deficient Brattleboro rats have been reported. Homozygous di/di Brattleboro rats showed a decreased plasma glucose level and insulin level when compared to control +/+ Long-Evans rats (13) but presented an enhanced glucose tolerance when compared to heterozygous di/+ rats (14). V1aR knockout mice and V1bR knockout mice exhibited opposite phenotype concerning insulin sensitivity but the contribution of VP to glucose metabolism seems larger through V1aR than through V1bR since mice lacking both receptors and fed a high fat diet displayed an impaired glucose tolerance similar to that seen in mice with only V1aR inactivation (13). Noteworthy, these mice presented alterations in plasma

volume, body weight gain and calorie intake (11, 13). These features, in addition to the complex interactions between receptor signalling and compensatory mechanisms that occur in life-long absence of one component of the vasopressin system, could explain the apparent discrepancy with our results.

To study the relationship between vasopressin and glucose metabolism *in vivo*, we used a different approach. We modified the normal circulating VP concentration in adult rats by either a chronic infusion of vasopressin or an increase in water intake, according to well-established protocols previously used in our laboratory (23). All other conditions remained equal between groups, including daily food composition and consumption. Noteworthy, high water intake increased markedly daily urine volume, but not enough to induce the formation of hypo-osmotic urine. Rats excreted this extra water appropriately since no sign of plasma dilution appeared, as indicated by unchanged plasma sodium concentration and hematocrit. This "bidirectional" protocol mimicked the wide inter-individual variability of the usual vasopressin concentration and osmotic thresholds for thirst and vasopressin secretion observed in humans (28). To our knowledge, this is the first study assessing the role of chronic alterations in vasopressin level on glucose metabolism.

Our results show that high VP level induces disorders in glucose metabolism as early as two weeks after onset of the treatment in both lean and obese Zucker rats. High VP induced a moderate but significant hyperglycemic effect in lean rats. In fasted obese rats, high VP induced a marked increase in insulinemia compared to the control group, with no difference in plasma glucose. Consistent with this observation, GTT and ITT revealed that high VP promotes glucose intolerance and accelerates recovery after insulin-induced hypoglycemia.



Several mechanisms could account for the impaired glucose tolerance and insulin sensitivity observed during high VP condition. One is impaired intracellular glucose metabolism due to increased gluconeogenesis and/or increased glycogenolysis through V1aR as suggested by acute experiments (29, 30). This hypothesis is supported by the upregulation of V1aR in the liver of High-VP rats and higher glycemia and increased production of glucose observed during the pyruvate challenge. Moreover, other VP-induced effects on glycogen metabolism could contribute to disorders of glucose metabolism. Vasoconstrictive effects of VP and resulting decrease in hepatic blood flow could cause hypoxia-driven glycogenolysis (4). Hepatocytes shrinkage induced by hyperosmolality has been shown to inhibit protein and glycogen synthesis (31). Thus, although plasma osmolality was not significantly different between the groups, we cannot exclude that a mild alteration in ambient osmolality of insulin target tissues could be an additional factor contributing to glucose intolerance.

Besides insulin, glucagon is a major hormone in glucose homeostasis and plays a role in the pathogenesis of hyperglycemia in diabetes (review (32)). Vasopressin could increase glucagon secretion through activation of V1b receptors in pancreatic islets (6-8), or indirectly by stimulating epinephrine secretion by chromaffin cells of the adrenal medulla (33). Crosstalk between V1a receptor and glucagon receptor and their signalling pathways has been described also in hepatocytes (34, 35). However glucagon is not likely to play a role in the disturbances of glucose metabolism observed in the present study because basal plasma glucagon concentration and glucagon response during ITT were unaltered by chronic VP treatment.

Steatosis has often been associated with hepatic insulin resistance in the context of obesity (36). Noteworthy, the effects of VP on hepatic lipid accumulation and glucose tolerance are dissociated in our model. Low-VP rats did not display improvement of glucose tolerance compared to control obese rats but exhibited a marked decrease in hepatic steatosis with low hepatic content in triglycerides and cholesterol. High-VP rats displayed impairment of glucose tolerance but no aggravation of hepatic steatosis. A similar dissociation was already reported in some murine models of obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus (37, 38).

Previous studies on VP and lipogenesis have reported contradictory results (4, 39-41). Assimacopoulos-Jeannet et al (41) showed that VP increased lipogenesis in isolated hepatocytes but when concentration of lactate in the medium was increased, basal lipogenesis was increased and the stimulatory effect of VP lost. We can speculate that lipogenesis is already maximally stimulated in obese Zucker rats, thus preventing a possible VP-induced additional effect. In contrast, a reduction in circulating VP level may decrease steatosis. The lower mRNA abundance of FAS and SREBP1c in the Low-VP group suggests a decrease in *de novo* synthesis of fatty acids, although a decrease in fluxes of non esterified fatty acids from the adipose tissue to the liver, related to a reduced vasoconstrictive effect of VP, cannot be excluded. This decrease in fatty acid availability, in addition to decreased expression of AQP9, the major pathway of glycerol entry in hepatocytes, is probably responsible, at least in part, for the fall in triglyceride content. The unaltered mRNA expression of SREBP-2, the key regulator for the cholesterol biosynthesis, suggests that the decrease in cholesterol content in the Low-VP group is due to an increase in cholesterol degradation rather than a decrease in synthesis.

Although the effect of high water intake on the reduction in steatosis is likely due to the reduction in VP plasma level, other hormonal changes related to increased water intake could be involved. Apelin, an adipokine with anti-obesity properties, is also a neurohypophyseal hormone as vasopressin. Apelin and vasopressin are secreted in response to opposite change in plasma osmolality and exert opposite effects in acute regulation of water balance both centrally and at the level of the kidney (42-44). Apelin has been shown to be involved in glucose metabolism disorders and in hepatic fibrosis (45, 46). However, the finding of similar concentrations of circulating apelin in the different groups of the present study does not support an apelin-mediated effect. The mechanisms responsible for the low-VP/ high hydration level effect on liver steatosis remain to be clarified.

In conclusion, our study supports strongly that there is a causality link in the associations observed in epidemiological studies between high copeptin level or low water intake and the prevalence and incidence of hyperglycemia, metabolic syndrome and type 2 diabetes. Our results reveal the role played by VP and hydration not only in the development of glucose intolerance but also of hepatic steatosis in rats. Further studies are required to elucidate the mechanisms responsible for these effects. Overall, these findings suggest that, in people who are at risk of diabetes and have an inappropriate hydration status, a moderate increase in water intake, a costless lifestyle change not exclusive of other recommendations, may help to prevent or delay the onset of hyperglycemia and subsequent diabetes together with its renal complications. Therapeutic perspectives may include also pharmacological interventions targeted on V1 vasopressin receptors. These approaches deserve to be tested.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful for the technical assistance of the staff of the phenotyping platform (Cordeliers Research Center, Paris, France) and more particularly to Georges Zadigue.

### **Funding**

This study was supported by grants from the European Research Council (project 282255 Cardioprevent), the Swedish Heart and Lung Foundation, the Swedish Research Council, INSERM, Pierre & Marie Curie and Paris Descartes Universities.

**No potential conflicts of interest** relevant to this article was reported.

### **Contribution statement**

CM, RR, LB, OM, NB participated in the conception and design of the study. CT, CC, LW, DD, MFA, EP, IH performed research. CT, CM, DB, VP, FF, SE, GB, RR, LB, OM, NB analyzed data and contributed to discussion. CT, RR, LB, OM, NB contributed to drafting of the manuscript and revising it critically for important intellectual content. All authors gave final approval for the article to be published.

### **Guarantor names**

CT and NB are the guarantors of this work

Parts of this study were presented in abstract form at the congress of French Society of Diabetes (Paris, march 2014) and congress of French Society of Neuroendocrinology (Fes, sept 2013).

## REFERENCES

1. Zerbe RL, Vinicor F, Robertson GL. Plasma vasopressin in uncontrolled diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; **28**: 503-508
2. Brooks DP, Nutting DF, Crofton JT, Share L. Vasopressin in rats with genetic and streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 1989; **38**: 54-57
3. Yi SS, Hwang IK, Kim YN, Kim IY, Pak SI, Lee IS, Seong JK, Yoon YS. Enhanced expressions of arginine vasopressin (Avp) in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of type 2 diabetic rats. *Neurochem Res* 2008; **33**: 833-841
4. Hems DA, Whitton PD, Ma GY. Metabolic actions of vasopressin, glucagon and adrenalin in the intact rat. *Biochim Biophys Acta* 1975; **411**: 155-164
5. Rofo AM, Williamson DH. Metabolic effects of vasopressin infusion in the starved rat. Reversal of ketonaemia. *Biochem J* 1983; **212**: 231-239
6. Lee B, Yang C, Chen TH, al-Azawi N, Hsu WH. Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am J Physiol* 1995; **269**: E1095-1100
7. Yibchok-Anun S, Cheng H, Chen TH, Hsu WH. Mechanisms of AVP-induced glucagon release in clonal alpha-cells in-R1-G9: involvement of Ca(2+)-dependent and -independent pathways. *Br J Pharmacol* 2000; **129**: 257-264
8. Abu-Basha EA, Yibchok-Anun S, Hsu WH. Glucose dependency of arginine vasopressin-induced insulin and glucagon release from the perfused rat pancreas. *Metabolism* 2002; **51**: 1184-1190
9. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 1982; **299**: 355-357
10. Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G. Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-

- phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **300**: 1122-1130
11. Aoyagi T, Birumachi J, Hiroyama M, Fujiwara Y, Sanbe A, Yamauchi J, Tanoue A. Alteration of glucose homeostasis in V1a vasopressin receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2007; **148**: 2075-2084
  12. Fujiwara Y, Hiroyama M, Sanbe A, Aoyagi T, Birumachi J, Yamauchi J, Tsujimoto G, Tanoue A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *J Physiol* 2007; **584**: 235-244
  13. Nakamura K, Aoyagi T, Hiroyama M, Kusakawa S, Mizutani R, Sanbe A, Yamauchi J, Kamohara M, Momose K, Tanoue A. Both V(1A) and V(1B) vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol* 2009; **613**: 182-188
  14. Nakamura K, Yamashita T, Fujiki H, Aoyagi T, Yamauchi J, Mori T, Tanoue A. Enhanced glucose tolerance in the Brattleboro rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **405**: 64-67
  15. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem* 2006; **52**: 112-119
  16. Saleem U, Khaleghi M, Morgenthaler NG, Bergmann A, Struck J, Mosley TH, Jr., Kullo JJ. Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 2558-2564
  17. Enhorning S, Wang TJ, Nilsson PM, Almgren P, Hedblad B, Berglund G, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Lindholm E, Groop L, Lyssenko V, Orho-Melander M, Newton-Cheh C, Melander O. Plasma copeptin and the risk of diabetes mellitus. *Circulation* 2010; **121**: 2102-2108

18. Roussel R, Fezeu L, Bouby N, Balkau B, Lantieri O, Alhenc-Gelas F, Marre M, Bankir L. Low water intake and risk for new-onset hyperglycemia. *Diabetes Care* 2011; **34**: 2551-2554
19. Bardoux P, Bichet DG, Martin H, Gallois Y, Marre M, Arthus MF, Lonergan M, Ruel N, Bouby N, Bankir L. Vasopressin increases urinary albumin excretion in rats and humans: involvement of V2 receptors and the renin-angiotensin system. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 497-506
20. Bankir L, Bouby N, Ritz E. Vasopressin: a novel target for the prevention and retardation of kidney disease? *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**: 223-239
21. Meijer E, Bakker SJ, Halbesma N, de Jong PE, Struck J, Gansevoort RT. Copeptin, a surrogate marker of vasopressin, is associated with albuminuria in a large population cohort. *Kidney Int* 2010; **77**: 29-36
22. Velho G, Bouby N, Hadjadj S, Matallah N, Mohammedi K, Fumeron F, Potier L, Bellili-Munoz N, Taveau C, Alhenc-Gelas F, Bankir L, Marre M, Roussel R. Plasma copeptin and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabetes Care* 2013; **36**: 3639-3645
23. Bouby N, Bachmann S, Bichet D, Bankir L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol* 1990; **258**: F973-979
24. Bichet DG, Arthus MF, Barjon JN, Lonergan M, Kortas C. Human platelet fraction arginine-vasopressin. Potential physiological role. *J Clin Invest* 1987; **79**: 881-887
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408
26. Bergmeyer HU, Ed. Methods of enzymatic analysis. *New York, Academic Press* 1974:

27. Perucca J, Bichet DG, Bardoux P, Bouby N, Bankir L. Sodium excretion in response to vasopressin and selective vasopressin receptor antagonists. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1721-1731
28. Zerbe RL, Miller JZ, Robertson GL. The reproducibility and heritability of individual differences in osmoregulatory function in normal human subjects. *J Lab Clin Med* 1991; **117**: 51-59
29. Hems DA, Whitton PD. Stimulation by vasopressin of glycogen breakdown and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J* 1973; **136**: 705-709
30. Wideman CH, Murphy HM. Modulatory effects of vasopressin on glucose and protein metabolism during food-restriction stress. *Peptides* 1993; **14**: 259-261
31. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998; **78**: 247-306
32. Cryer PE. Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* 2012; **153**: 1039-1048
33. Guillon G, Grazzini E, Andreu M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C, Boccara G, Derick S, Chouinard L, Gallo-Payet N. Vasopressin : a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res* 1998; **24**: 703-710
34. Morgan NG, Shipp CC, Exton JH. Studies on the mechanism of inhibition of hepatic cAMP accumulation by vasopressin. *FEBS Lett* 1983; **163**: 277-281
35. Chabardes D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca<sup>2+</sup>-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca<sup>2+</sup> increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal* 1999; **11**: 651-663
36. den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 644-649



37. Wendel AA, Li LO, Li Y, Cline GW, Shulman GI, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 deficiency in ob/ob mice diminishes hepatic steatosis but does not protect against insulin resistance or obesity. *Diabetes* 2010; **59**: 1321-1329
38. Moon YA, Liang G, Xie X, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Koteliensky V, Brown MS, Goldstein JL, Horton JD. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab* 2012; **15**: 240-246
39. Kirk CJ, Hems DA. The control by vasopressin of carbohydrate and lipid metabolism in the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1979; **583**: 474-482
40. Ma GY, Hems DA. Inhibition of fatty acid synthesis and stimulation of glycogen breakdown by vasopressin in the perfused mouse liver. *Biochem J* 1975; **152**: 389-392
41. Assimacopoulos-Jeannet F, Denton RM, Jeanrenaud B. Stimulation of hepatic lipogenesis and acetyl-coenzyme A carboxylase by vasopressin. *Biochem J* 1981; **198**: 485-490
42. Azizi M, Iturrioz X, Blanchard A, Peyrard S, De Mota N, Chartrel N, Vaudry H, Corvol P, Llorens-Cortes C. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1015-1024
43. Hus-Citharel A, Bouby N, Frugiere A, Bodineau L, Gasc JM, Llorens-Cortes C. Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int* 2008; **74**: 486-494
44. Galanth C, Hus-Citharel A, Li B, Llorens-Cortes C. Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr Pharm Des* 2012; **18**: 789-798
45. Knauf C, Drougard A, Fournel A, Duparc T, Valet P. Hypothalamic Actions of Apelin on Energy Metabolism: New Insight on Glucose Homeostasis and Metabolic Disorders. *Horm Metab Res* 2013:

46. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernandez-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jimenez W. The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 2008; **48**: 1193-1201

**Table 1: Physiological parameters of Lean Zucker rats after two weeks of treatment**

	Low-VP	Norm-VP	High-VP
Body weight (g)	280 ± 9	284 ± 10	270 ± 6
Water intake (ml.d <sup>-1</sup> )	62.2 ± 0.5 <sup>a, b</sup>	17.8 ± 0.7	18.4 ± 0.5
Urine vasopressin excretion (ng.d <sup>-1</sup> )	1.4 ± 0.2 <sup>a, b</sup>	11.0 ± 1.5	264 ± 39 <sup>c</sup>
Urine volume (ml.d <sup>-1</sup> )	29.5 ± 0.7 <sup>a, b</sup>	6.3 ± 0.5	6.5 ± 0.2
Urine osmolality (mosm/kg H <sub>2</sub> O)	473 ± 15 <sup>a, b</sup>	2320 ± 78	2296 ± 78
Hematocrit (%)	50.2 ± 0.7	48.0 ± 1.2	49.3 ± 0.7
Plasma osmolality (mosm.kg H <sub>2</sub> O)	297 ± 1	297 ± 1	296 ± 1
Plasma Na <sup>+</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	147 ± 1	146 ± 1	147 ± 1
Plasma K <sup>+</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	4.7 ± 0.3	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.3

High-VP, Norm-VP and Low-VP = rats with chronically increased, normal, or decreased VP level, respectively.

Results are mean ± SEM. N= 7-8/group. ANOVA, followed Fisher's *post hoc test*. Low-VP vs. Norm-VP: a, p<0.0001; Low-VP vs. High-VP: b, p<0.0001, High-VP vs Norm-VP: c, p<0.0001.

**Table 2: Physiological parameters of Obese Zucker rats after two weeks of treatment**

	Low-VP	Norm-VP	High-VP
Body weight (g)	315 ± 8	317 ± 8	309 ± 6
Water intake (ml.d <sup>-1</sup> )	88.0 ± 4.0 <sup>a, b</sup>	17.4 ± 1.1	18.0 ± 1.1
Urine vasopressin excretion (ng.d <sup>-1</sup> )	0.9 ± 0.3 <sup>a, b</sup>	14.3 ± 1.8	96.6 ± 13.5 <sup>c</sup>
Urine volume (ml.d <sup>-1</sup> )	49.9 ± 4.2 <sup>a, b</sup>	10.8 ± 0.7	10.5 ± 0.5
Urine osmolality (mosm/kg H <sub>2</sub> O)	582 ± 32 <sup>a, b</sup>	2484 ± 71	2538 ± 61
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.6	43.4 ± 1.8	43.1 ± 1.2
Plasma osmolality (mosm/kg H <sub>2</sub> O)	303 ± 3	303 ± 5	301 ± 4
Plasma Na <sup>+</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	144 ± 1	141 ± 1	142 ± 1
Plasma K <sup>+</sup> (mmol.L <sup>-1</sup> )	5.2 ± 0.4	5.6 ± 0.6	5.5 ± 0.6
Plasma triglycerides (mmol L <sup>-1</sup> )	0.59 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.48 ± 0.07
Plasma cholesterol (mmol L <sup>-1</sup> )	3.45 ± 0.15	4.37 ± 0.26	3.34 ± 0.41
Plasma apelin (ng.mL <sup>-1</sup> )	4.9 ± 0.3	4.4 ± 0.3	3.8 ± 0.3

High-VP, Norm-VP and Low-VP = rats with chronically increased, normal, or decreased VP level, respectively.

Results are means ± SEM. N= 7-8/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. Low-VP vs. Norm-VP :a, p<0.0001; Low-VP vs. High-VP: b, p<0.0001, High-VP vs Norm-VP: c, p<0.0001

**Table 3. Areas under curves of responses to glucose, insulin or pyruvate test in obese Zucker rats with low, normal or high vasopressin level**

	Low-VP	Norm-VP	High-VP
<b><u>GTT week 2</u></b>			
Glycemia (mmol. l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	153 ± 25	174 ± 38	335 ± 23***†††
Insulinemia (nmol.l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	34142 ± 4010	40279 ± 6170	78656 ± 18145***††
<b><u>GTT week 4</u></b>			
Glycemia (mmol. l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	300 ± 46	391 ± 44	524 ± 38*††
Insulinemia (nmol.l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	72446 ± 6214	56407 ± 14459	126606 ± 20947***†
<b><u>ITT week 2</u></b>			
Glycemia (mmol. l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	316 ± 15***	146 ± 15	172 ± 19†††
Insulinemia (nmol.l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	167572 ± 27396*	253679 ± 36524	313608 ± 11555***†††
Glucagonemia (pmol.l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	1274 ± 57	1304 ± 39	1260 ± 61
<b><u>ITT week 4</u></b>			
Glycemia (mmol. l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	134 ± 25	113 ± 24	130 ± 18
<b><u>Pyruvate test week 2</u></b>			
Glycemia (mmol. l <sup>-1</sup> .2hr <sup>-1</sup> )	832 ± 97	805 ± 34	989 ± 98

Data are means ± SEM. N= 5-8/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. High-VP or Low-VP vs. Norm-VP : \* p<0.05; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; High-VP vs Low-VP: † p<0.05; †† p<0.01, ††† p<0.001

**Table 4: Gene expression of key enzymes of carbohydrate pathways and glucose transporters in liver of obese Zucker rats with low, normal or high vasopressin level**

	<b>Low-VP</b>	<b>Norm-VP</b>	<b>High-VP</b>
PEPCK	1.39 ± 0.20	1.00 ± 0.37	0.99 ± 0.10
G6Pase	0.96 ± 0.13	1.00 ± 0.08	1.10 ± 0.15
Glycogen Phosphorylase	0.92 ± 0.23	1.00 ± 0.21	0.95 ± 0.17
Glut2	1.17 ± 0.28	1.00 ± 0.15	1.14 ± 0.16
Glut1	0.90± 0.31	1.00 ± 0.13	0.95 ± 0.27

Results are means ± SEM. N=6/group. Results for each gene are expressed relative to the mean of the corresponding Norm-VP group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*: no significant difference.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** High VP level increases glycemia and alters glucose tolerance in lean Zucker rats. (A) Time-dependent effect of VP on fasting glycemia level. (B) Glycemic response during i.p. GTT performed four weeks after onset of treatments inducing Low (white diamonds, dotted line), Normal (white squares, continuous line) or High VP level (black squares, thick line). Data are expressed as changes relative to time 0.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N=6/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. High-VP vs. Norm-VP \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ ; High-VP vs Low-VP: §§  $p<0.01$ , §§§  $p<0.001$ ; time effect: ††  $p<0.01$

**Figure 2.** High VP level induces glucose intolerance in obese Zucker rats. (A) Fasting glycemia and insulinemia and calculated insulin-resistance index. (B) Intraperitoneal GTT and (C) pyruvate challenge were performed two weeks after onset of treatments inducing Low (white diamonds, dotted line), Normal (white squares, continuous line) or High VP level (black squares, thick line). Data are expressed as changes relative to time 0.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N=8/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. High-VP vs. Norm-VP:\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ ; High-VP vs Low-VP: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ , §§§  $p<0.001$ ; time effect: ††  $p<0.01$ , †††  $p<0.001$

**Figure 3.** Effect of VP level on glycemia and glucagonemia responses during ITT in obese Zucker rats. Intraperitoneal ITT was performed two weeks after onset of treatments inducing Low (white diamonds, dotted line), Normal (white squares, continuous line) or High VP level (black squares, thick line).

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N=7/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. High-VP vs. Norm-VP: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ ; High-VP vs Low-VP: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ , §§§  $p<0.001$ ; Low-VP vs Norm-VP: #  $p<0.05$ , ###  $p<0.001$

**Figure 4.** Low VP level induced by high hydration reverses hepatosteatorosis in obese Zucker rats.

(A) Representative image of liver tissue. Sections were stained with hematoxylin-eosin and Sirius red. Bar = 100  $\mu$ m. (B) Hepatic concentration of triglycerides (TG), cholesterol and glycogen. (C) mRNA levels of molecular species involved in fatty acids, cholesterol and triglyceride synthesis. Data were obtained two weeks after onset of treatments.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. N=6/group. ANOVA, followed by Fisher's *post hoc test*. High-VP vs. Norm-VP: \*  $p<0.05$ ; High-VP vs Low-VP: §  $p<0.05$ ; Low-VP vs Norm-VP: #  $p<0.05$



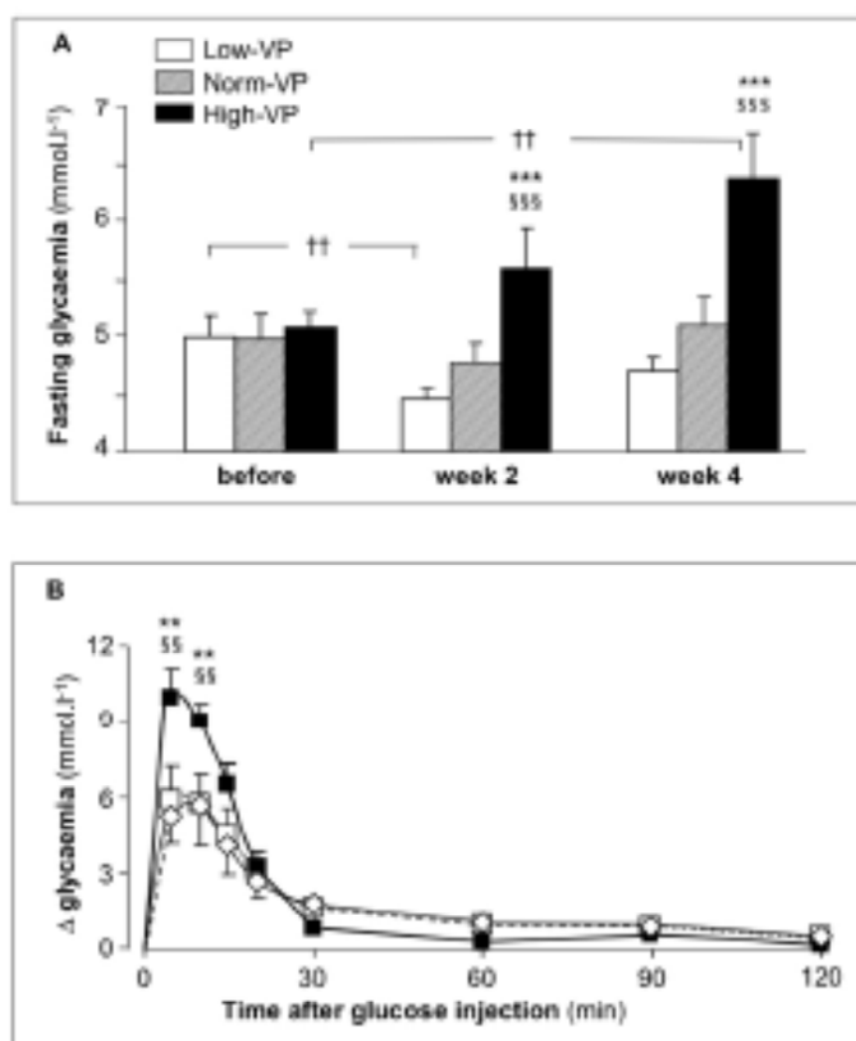


figure 1  
352x497mm (72 x 72 DPI)

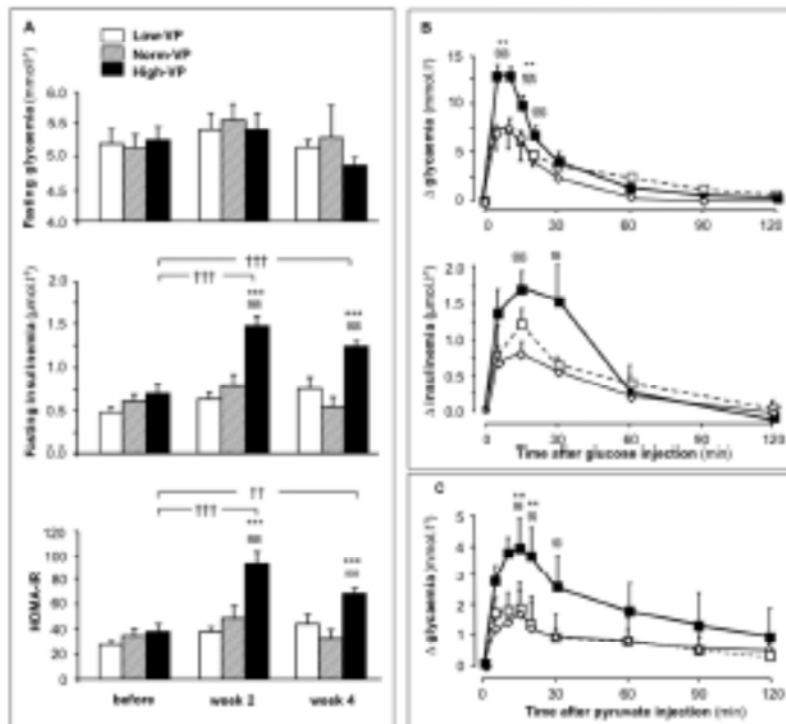


figure 2  
352x497mm (72 x 72 DPI)

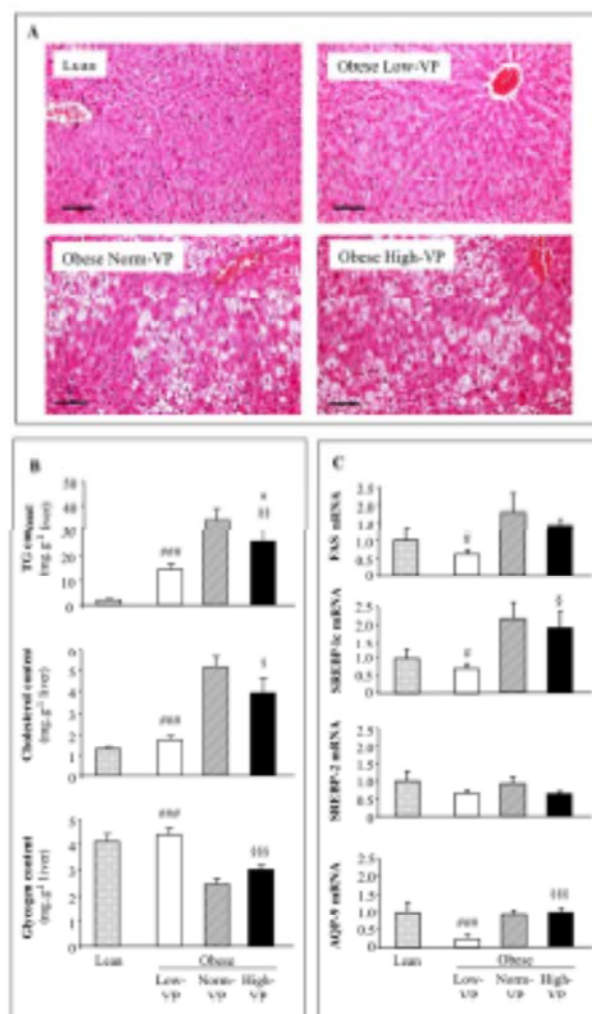


Figure 4  
352x497mm (72 x 72 DPI)

### **Analysis of hepatic gene expression**

Total RNA was isolated using TRIzol (Life Technologies, St Aubin, France). First strand cDNA was obtained from 2 µg total RNA using Superscript-II reverse transcriptase (Life Technologies, St Aubin, France). Real time PCR was performed on the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System by using TaqMan Universal Master Mix and Assays-on-Demand Gene Expression Probes for V1aR (*Avpr1a*), G6P (*G6pc*), GPI (*Pygl*), PEPCK (*Pck1*), glucose transporter-1 (*Slc2a1*) glucose transporter-2 (*Slc2a2*) and AQP-9 (*Aqp9*) (AppliedBiosystems, Courtaboeuf, France). Real time PCR for FAS (*Fasn*), SREBP-1c (*Srebf1*), SREBP-2 (*Srebf2*) genes was performed on the MyiQ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France) by using the qPCR Core Kit for SYBR® Green assay (Eurogentec, Angers, France) and specific primers designed with Primer Express software (AppliedBiosystems). The forward and reverse primers were as follows for SREBP-1c: 5'-ggagccatggattgcacatt-3', 5'-ggccccgggaagtcaactgt-3'; FAS: 5'-gtgatagccggtatgtccgg-3', 5'-ggcgtcgaacttgacagat-3'; SREBP-2: 5'-cccttgacttccttgctgca-3', 5'-gcgtgagtggtggcgaatc-3'. Data were normalized to 18S rRNA. Changes in the target genes relative to their mean expression in the Norm-VP group were calculated by the 2- $\Delta\Delta$ CT comparative method.